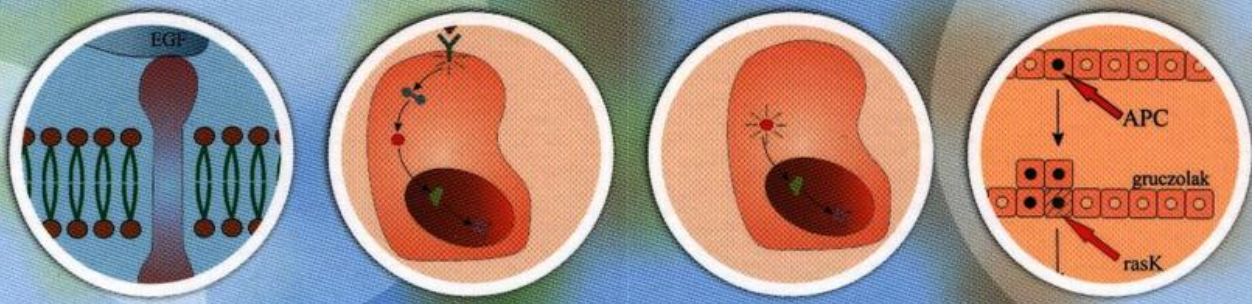
ELSEVIER
URBAN&PARTNER

Redakcja
JERZY KAWIAK
MACIEJ ZABEL

SEMINARIA Z CYTOFIZJOLOGII

dla studentów medycyny, weterynarii i biologii



2. wydanie

Wszelkie prawa zastrzeżone, zwłaszcza prawo do przedruku i tłumaczenia na inne języki. Żadna z części tej książki nie może być w jakiejkolwiek formie publikowana bez uprzedniej pisemnej zgody Wydawnictwa. Dotyczy to również sporządzania fotokopii i mikrofilmów oraz przenoszenia danych do systemów komputerowych.

© Copyright by Elsevier Urban & Partner, Wrocław 2014

Redakcja naukowa wydania II:
Prof. dr hab. Jerzy Kawiak
Prof. dr hab. n. med. Maciej Zabel

Autorzy wydania II:
prof. dr hab. Hieronim Bartel (rozdz. 1)
prof. dr hab. Jacek Bigda (rozdz. 2)
prof. dr hab. Piotr Dzięgiel (rozdz. 14)
dr Jolanta Godlewska-Jędrzejczyk (rozdz. 10)
dr Grażyna Hoser (rozdz. 5)
prof. dr hab. Lilla Hryniewiecka (rozdz. 9)
dr n. przyrodniczych Ewa Jagoda (rozdz. 12)
prof. dr hab. Jerzy Kawiak (rozdz. 6, 11, 13)
prof. dr hab. Janusz Kubrakiewicz (rozdz. 5, 7)
prof. dr hab. Jan A. Litwin (rozdz. 15)
prof. dr hab. Jacek Malejczyk (rozdz. 10)
dr n. med. Agnieszka Malińska (rozdz. 12)
prof. dr hab. Stanisław Moskalewski (rozdz. 8)
prof. dr hab. Michał Nowicki (rozdz. 14)
prof. dr hab. Stanisław Orkisz (rozdz. 1)
dr hab. Tadeusz Pacuszka (rozdz. 6)
dr hab. Małgorzata Piasecka (rozdz. 9)
dr hab. Marzenna Podhorska-Okołów, prof. nadzw. (rozdz. 14)
prof. dr hab. Wojciech Sawicki (rozdz. 3)
prof. dr hab. Cezary Wójcik (rozdz. 4, 8)
prof. dr hab. n. med. Maciej Zabel (rozdz. 5, 7, 11, 13)

Opracowanie graficzne rycin – mgr inż. Monika Świerczewska

UNIWERSYTET ZIELONOGÓRSKI BU
Ks 3
23321

Redaktor naczelny: lek. med. Edyta Błażejewska
Redaktor nadzorujący: Renata Wręczycka
Redaktor tekstu: Krystyna Budnik
Opracowanie skorowidza: Dominika Macuta

ISBN 978-83-7609-715-2

Elsevier Urban & Partner
ul. Kościuszki 29, 50-011 Wrocław
tel.: 71 330 61 61, faks: 71 330 61 60
biuro@elsevier.com

www.elsevier.pl

Łamanie i przygotowanie do druku: Andrzej Kuriata
Druk i oprawa: Drukarnia Kursor, Wrocław

AKC. 2016/290/D

Spis treści

Przedmowa ix
Przedmowa do wydania drugiego xi
Autorzy xiii
Miary oraz skróty aminokwasów używane w biologii komórki xiv
Wykaz skrótów xv

ROZDZIAŁ 1
Organizacja i funkcjonowanie jądra komórkowego 1
Stanisław Orkisz, Hieronim Bartel

Jądro komórkowe – dane ogólne 3 / Otoczka jądrowa 4 / Macierz jądrowa 6 / Funkcja macierzy jądrowej 7 / Budowa i struktura kwasów nukleinowych 7 / Replikacja DNA 9 / Naprawa DNA 11 / Organizacja strukturalna chromatyny 13 / Strefa interchromatyny 16 / Jąderko – struktura i funkcja 19 / Odczytywanie informacji genetycznej 20 / Biogeneza rybosomów 23

ROZDZIAŁ 2
Geny – lokalizacja, struktura, funkcja, dziedziczenie. Inżynieria genetyczna 27
Jacek Bigda

Chromatyna i chromosomy 28 / Organizacja i funkcjonowanie genów 29 / Powtarzające się sekwencje DNA 30 / Zespoły genów 31 / Kontrola ekspresji genów 32 / Regulacja transkrypcji – sekwencje promotorowe i regulatorowe 32 / Regulacja – rola sekwencji promotorowych 33 / Polimerazy RNA 34 / Regulacja transkrypcji a struktura chromatyny 35 / Czynniki transkrypcyjne 35 / Genotyp a fenotyp – rola swoistych czynników transkrypcyjnych 37 / Kontrola ekspresji genu – regulacja stabilności RNA 38 / Rekombinacja, tasowanie eksonów 39 / Izolacja kwasów nukleinowych 41 / Ekspresja białek 42

ROZDZIAŁ 3
Cykl komórkowy, proliferacja i starzenie tkanek 45
Wojciech Sawicki

Cykl komórkowy, proliferacja, hipertrofia, akrecja 49 / Faza G1 49 / Faza S 50 / Faza G2 52 / Profaza 53 / Wrzeciono podziałowe 54 / Telofaza 55 / Odmiana cyklu komórkowego: endoreduplikacja 56 / Regulacja cyklu komórkowego z zewnątrz 57 / Rodzaje populacji komórkowych 58 / Cykl komórkowy a wirusy 59 / Starzenie tkanek 62 / Mutacje DNA a starzenie 63 / Zmiana stanu metylacji DNA z wiekiem 64 / Rola uszkodzeń DNA 67 / Podwzgórze a starzenie 70

ROZDZIAŁ 4
Apoptoza 73
Cezary Wójcik

Apoptoza a martwica 74 / Kaspazy 76 / Szlak wewnątrzpochodny 76 / Szlak zewnątrzpochodny 78 / Egzekucja apoptozy 78 / Medyczne aspekty apoptozy 81 / Metody wykrywania apoptozy 81

ROZDZIAŁ 5
Mechanizmy rozwoju i różnicowanie komórek 83
Maciej Zabel, Janusz Kubrakiewicz, Grażyna Hoser

Stabilność genomu w czasie różnicowania 86 / Zróżnicowana ekspresja genów – podstawa specjalizacji strukturalnej i funkcjonalnej komórek 88 / „Dialog międzykomórkowy" w różnicowaniu 91 / Informacja pozycyjna 93 / Pamięć komórkowa 95 / Odnowa i przebudowa tkanek i narządów 96

ROZDZIAŁ 6

Błony biologiczne i transport przez błony 101

Jerzy Kawiak, Tadeusz Pacuszka

Błona komórkowa – oddzielenie środowiska wewnętrznego komórki od otoczenia 103 / Środowisko wewnątrz komórki podzielone błonami (u eukariota) 103 / Dwuwarstwa fosfolipidowa – podstawowa struktura błon biologicznych 104 / Białka błonowe 110 / Błona erytrocytu i szkielet błony 113 / Białko integralne leukocytów – CD45 115 / Glikokaliks 116 / Transport cząstek przez błony biologiczne 116 / Endocytoza i kaweole 126 / Oporność wielolekowa 127 / Zjawisko fuzji błon 128

ROZDZIAŁ 7

Cytoszkielet. 131

Maciej Zabel, Janusz Kubrakiewicz

Mikrotubule 132 / Budowa i tworzenie się mikrotubul 133 / Białka towarzyszące mikrotubulom 135 / Białka motoryczne związane z mikrotubulami 137 / Struktury komórkowe zbudowane z mikrotubul 139 / Filamenty pośrednie 141 / Budowa i klasyfikacja filamentów pośrednich 142 / Rola filamentów pośrednich 143 / Mikrofilamenty 145 / Kora komórki 150 / Aparat kurczliwy mięśni 151

ROZDZIAŁ 8

Wybrane procesy cytoplazmatyczne 161

Cezary Wójcik, Stanisław Moskalewski

Wprowadzenie 163 / Adresowanie białek w komórce 164 / Translokacja białek do siateczki śródplazmatycznej 165 / Sortowanie białek organelli błoniastych 166 / Transport pęcherzykowy 167 / Sortowanie białek w komórkach spolaryzowanych 169 / Import białek do peroksysomów 169 / Import białek do mitochondriów 170 / Transport jądrowo-cytoplazmatyczny 171 / Krople lipidowe 172 / Białka opiekuńcze 173 / Ubikwitynacja białek 174 / Proteasomy 174 / Degradacja związana z siateczką śródplazmatyczną (ERAD) 176 / Odpowiedź rozfałdowanych białek (UPR) 176

ROZDZIAŁ 9

Morfologia i funkcja mitochondriów 179

Lilla Hryniewiecka, Małgorzata Piasecka

Morfologia mitochondriów 181 / Liczba i rozmieszczenie mitochondriów w komórce 181 / Lokalizacja i topografia błon mitochondrialnych 181 / Morfologia mitochondriów 185 / Uszkodzenia mitochondriów 187 / Funkcja mitochondriów – mitochondria jako organelle wytwarzające ATP 188 / ATP – uniwersalny przenośnik energii swobodnej w komórce 188 / Budowa łańcucha oddechowego 189 / Potencjały oksydoredukcyjne (redoks) 190 / Hipoteza chemiosmotyczna Mitchella; siła protonomotoryczna 190 / Syntaza ATP 191 / Kontrola oddechowa i współczynnik kontroli oddechowej 192 / Inhibitory łańcucha oddechowego i fosforylacji oksydacyjnej 193 / Mutacje genomu mitochondrialnego przyczyną zaburzeń energetycznych 194

ROZDZIAŁ 10

Komunikacja międzykomórkowa – odbiór i przekazywanie sygnałów z udziałem receptorów . . 197

Jacek Malejczyk, Jolanta Godlewska-Jedrzejczyk

Komunikacja międzykomórkowa 199 / Receptory i rozpoznawanie informacji niesionej przez informatory pierwotne 201 / Klasyfikacja receptorów w zależności od budowy i sposobu transdukcji sygnału 203 / Regulacja funkcji receptorów 218 / Przekazywanie sygnałów przez synapsy 221 / Budowa synapsy chemicznej 221 / Synapsy elektryczne 222 / Funkcjonowanie synapsy chemicznej 223 / Neurotransmitery 223 / Biosynteza neurotransmiterów 224 / Uwalnianie neurotransmiterów 224 / Recyrkulacja pęcherzyków synaptycznych 226 / Unieczynnianie neurotransmiterów 227 / Kanały jonowe 227 / Receptory dla neurotransmiterów 228 / Receptory jonotropowe 228 / Receptory metabotropowe 229 / Regulacja przekazywania impulsów przez zakończenia presynaptyczne 229

ROZDZIAŁ 11

Cząsteczki adhezyjne i składnik substancji międzykomórkowej 231

Maciej Zabel, Jerzy Kawiak

Cząsteczki adhezyjne 232 / Białka wewnątrzkomórkowe związane z CAM 237 / Białka połączone z integrynami 238 / Cząsteczki międzykomórkowe 238 / Błona podstawna 245 / Połączenia międzykomórkowe 247 / Znaczenie CAM w fizjologii i patologii 251

ROZDZIAŁ 12

Podstawy immunologii 257

Agnieszka Malińska, Ewa Jagoda

Mechanizmy odporności wrodzonej (nieswoistej) 259 / Bariery fizyczne i chemiczne 259 / Czynniki humoralne (regulatory odporności wrodzonej) 259 / Komórki 262 / Mechanizmy odporności nabytej (swoistej) 267 / Odpowiedź komórkowa 267 / Odpowiedź humoralna 277 / Pamięć immunologiczna 280 / Recyrkulacja limfocytów 280 / Regulacja odpowiedzi immunologicznej 281 / Rola antygenu 281 / Regulacja na poziomie genów 281 / Regulacja neuroendokrynowa 281 / Przykłady chorób immunizacyjnych 282 / Deficyty immunologiczne 282 / Choroby autoimmunizacyjne 284

ROZDZIAŁ 13

Kancerogeneza 287

Jerzy Kawiak, Maciej Zabel

Podstawowe zaburzenia w komórce nowotworowej 288 / Brak obrony immunologicznej przeciw nowotworowi, tolerancja immunologiczna 288 / Klonalny rozwój nowotworu 289 / Nowotwory łagodne i złośliwe 290 / Onkogeny, onkogeny wirusowe 290 / Powstawanie onkogenów w komórkach niezakażonych retrowirusem 290 / Geny supresorowe nowotworów 292 / Telomery 296 / Przykład rozwoju nowotworu złośliwego 296 / Brak obrony immunologicznej przeciw nowotworowi – tolerancja immunologiczna 296 / Leczenie nowotworów 299

ROZDZIAŁ 14

Śródbłonek 301

Piotr Dzięgiel, Michał Nowicki, Marzenna Podhorska-Okołów

Ogólna charakterystyka komórek śródbłonka 302 / Regeneracja śródbłonka 304 / Dysfunkcja komórek śródbłonka a choroby układu krążenia 304 / Rola śródbłonka w procesie angiogenezy 306 / Rola śródbłonka w chorobach nowotworowych 307

ROZDZIAŁ 15

Metody badań budowy i funkcji komórek 311

Jan A. Litwin

Wstęp 312 / Metody przygotowania komórek do badań 312 / Homogenizacja i frakcjonowanie komórek 313 / Hodowla komórek 314 / Przygotowanie komórek do badań *in situ* 315 / Elektroforeza białek i kwasów nukleinowych 315 Identyfikacja rozdzielonych białek i kwasów nukleinowych 316 / Manipulowanie DNA 319 / Sekwencjonowanie DNA 319 / Hybrydyzacja kwasów nukleinowych 320 / Badania mikroskopowe 321 / Mikroskopy świetlne 321 / Mikroskopy elektronowe 324 / Specjalne metody stosowane w mikroskopii elektronowej 326 / Cytochemia klasyczna i cytochemia enzymów 327 / Immunocytochemia 328 / Hybrydocytochemia 330 / Znaczniki i wskaźniki wprowadzane do żywych komórek 330 / Metoda FRET 331 / Genetyczne znakowanie białek 331 / Autoradiografia 332 / Cytometria przepływowa 333 / Cyfrowe metody rejestracji i przekształcania obrazu mikroskopowego 334

HASŁA 335

Skorowidz 359

Przedmowa

Intensywne przygotowania do wydania podręcznika Seminaria z cytofizjologii, ze szczególnym uwzględnieniem zagadnień ważnych dla studentów medycyny, podjęliśmy w styczniu 2000 r. Postanowiliśmy, że podstawowe informacje z cytofizjologii powinny jak najpełniej oddawać obecny stan wiedzy na ten temat i stąd wiele zagadnień niemal do ostatniej chwili sprawdzaliśmy w najnowszej literaturze fachowej. Biologia komórki jest tą dziedziną, która rozwija się bardzo intensywnie.

Podział na seminaria i ich wybór był ustalony tak, by Czytelnik miał możliwie pełny obraz nauczanego przedmiotu. Istotne wydało się nam wskazanie na powiązanie zagadnień biologii komórki z problemami praktycznymi medycyny człowieka. Fragmenty te są opatrzone tytułem KLINIKA i drukowane na niebieskim tle.

Wielokrotnie konsultowaliśmy z autorami teksty poszczególnych seminariów, aby zawie- rały one tylko najbardziej potrzebne informacje. Szczegółowej informacji dostępnej w języku polskim Czytelnik może szukać w dołączonej do każdego rozdziału bibliografii. Są to najczęściej artykuły publikowane w czasopiśmie *Postępy Biologii Komórki*. Seminaria–rozdziały są pomyślane tak, aby w całości można je było wykorzystać podczas nauczania przedmiotu. Jest ich tyle, ile zajęć z cytofizjologii przewiduje program nauczania.

Maszynopis podręcznika był oceniany przez dwóch wybitnych specjalistów w tej dziedzinie: prof. dr hab. Marię Olszewską i prof. dr hab. Zofię Bielańską-Osuchowską. Za ich fachowe i życzliwe uwagi, które bardzo pomogły nam w przygotowaniu ostatecznej wersji tej publikacji, jesteśmy bardzo wdzięczni. Niektóre rozdziały były też dodatkowo opiniowane przez osoby niezaangażowane bezpośrednio w opracowanie podręcznika (magistrantów, asystentów i adiunktów). Dziękujemy za poświęcony czas i uwagi następującym osobom: Ewie Jagodzie, Monice Świeżewskiej, Magdzie Wdowiak i Teresie Wysockiej.

Jesteśmy niezmiernie wdzięczni Wydawnictwu Medycznemu Urban & Partner za podjęcie trudnego zadania, jakim było wydanie podręcznika w stosunkowo krótkim czasie, jeszcze w 2001 roku, przede wszystkim pani dyrektor Wiesławie Jeleńskiej-Hombek i redaktorowi Grzegorzowi Ociepce. Wysoko cenimy sobie fachową, życzliwą i sprawną pomoc Anny Jońskiej podczas składu podręcznika. Dziękujemy za zgodę na reprodukcję wybranych rycin Wydawnictwom: Taylor & Francis, Inc. (USA) za ryciny z podręcznika B. Albertsa i in. *Essential Cell Biology*, Wydawnictwu Naukowemu PWN SA za ryciny z książki Podstawy cytofizjologii pod red. J. Kawiaka i in. oraz Wydawnictwu Lekarskiemu PZWL za ryciny z publikacji W. Sawickiego *Histologia*. Redaktorom w opracowaniu podręcznika bardzo pomogły nowoczesne środki komunikacji: Medline oraz e-mail.

Szczegółowy opis przygotowań do wydania podręcznika nie jest próbą wytłumaczenia możliwych niedopracowań i przeoczeń. Redaktorzy będą bardzo wdzięczni za wszelkie uwagi krytyczne dotyczące zarówno całości, jak i poszczególnych seminariów. W podręczniku niektóre informacje są powtarzane w kilku rozdziałach, są jednak opisywane w różnym kontekście. Wprowadziliśmy też kilka usprawnień edytorskich, które mogą ułatwić korzystanie z podręcznika, a szczególnie powrót do już raz przeczytanego materiału, zgodnie z zasadą: *Repetitio est mater studiorum*. Przykładem tych usprawnień mogą być hasła umieszczone na początku każdego seminarium. Dodaliśmy również indeks skrótów z ich rozwinięciem w języku angielskim oraz używanym tłumaczeniem w języku polskim.

Sierpień 2001 r. *Jerzy Kawiak, Maciej Zabel*

Przedmowa do wydania drugiego

Intensywne przygotowania do drugiego wydania podręcznika *Seminaria z cytofizjologii* podjęliśmy jesienią 2013 r., czyli po ponad 10 latach od pierwszego wydania, co w nauce o biologii komórki stanowi epokę. Dlatego też przeprowadziliśmy dyskusję z autorami, aby nie powiększając objętości, uzupełnić i unowocześnić przedstawiane tematy. Czasem redaktorom nie udawało się to do końca i trzeba było zgodzić się ze zdaniem autora. Postanowiliśmy, że konieczne będzie też dodanie rozdziału poświęconego komórkom śródbłonka podobnie jak już wcześniej dołączono rozdział o nowotworach. Schorzenia naczyniowe i nowotworowe są bowiem największymi problemami medycznymi.

Podział na seminaria i ich wybór pozostawiono taki jak w wyd. I, by Czytelnik miał możliwie pełny obraz nauczanego przedmiotu. Istotne wydało się nam wskazanie na powiązanie zagadnień biologii komórki z problemami praktycznymi medycyny człowieka. Fragmenty te są opatrzone tytułem KLINIKA i drukowane na barwnym tle.

Szczegółowych informacji Czytelnik może szukać w unowocześnionej i dodanej do każdego rozdziału bibliografii. Czasem są to pozycje w języku angielskim, gdyż doszliśmy do wniosku, że znajomość tego języka jest powszechna u osób studiujących na wyższej uczelni, a również ułatwia poznanie fachowych terminów w tym języku.

W podręczniku zamieszczono również indeks skrótów z ich rozwinięciem w języku angielskim oraz używanym tłumaczeniem w języku polskim, a także indeksy miar.

Jesteśmy niezmiernie wdzięczni Wydawnictwu Elsevier Urban & Partner za podjęcie trudnego zadania, przede wszystkim Pani Redaktor Renacie Wręczyckiej. Wysoko cenimy sobie fachową, życzliwą i sprawną pomoc Pana Andrzeja Kuriaty podczas składu podręcznika. Specjalne uznanie składamy Pani Monice Świerczewskiej za trud związany z przygotowaniem rycin w całym podręczniku.

Redaktorzy będą bardzo wdzięczni za wszelkie uwagi krytyczne dotyczące zarówno całości, jak i poszczególnych seminariów.

Wrzesień 2014 r. *Jerzy Kawiak, Maciej Zabel*

Autorzy

Prof. dr hab. Hieronim Bartel
Katedra Biostruktury, Uniwersytet Medyczny w Łodzi (rozdział 1)

Prof. dr hab. Jacek Bigda
Katedra Biotechnologii Medycznej, Gdański Uniwersytet Medyczny (rozdział 2)

Prof. dr hab. Piotr Dzięgiel
Katedra i Zakład Histologii i Embriologii, Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu (rozdział 14)

Dr Jolanta Godlewska-Jędrzejczyk
Katedra i Zakład Histologii i Embriologii, Centrum Biostruktury Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, Warszawa (rozdział 10)

Dr Grażyna Hoser
Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, Studium Kliniczno-Dydaktyczne, Zakład Cytologii Klinicznej, Warszawa (rozdział 5)

Prof. dr hab. Lilla Hryniewiecka
Zakład Bioenergetyki, Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu (rozdział 9)

Dr n. przyrodniczych Ewa Jagoda
Katedra i Zakład Histologii i Embriologii, Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu (rozdział 12)

Prof. dr hab. Jerzy Kawiak
Instytut Biocybernetyki i Inżynierii Biomedycznej im. Macieja Nałęcza PAN, Warszawa (rozdział 6, 11, 13)

Prof. dr hab. Janusz Kubrakiewicz
Uniwersytet Wrocławski, Wydział Nauk Przyrodniczych, Instytut Zoologiczny, Wrocław (rozdział 5, 7)

Prof. dr hab. Jan A. Litwin
Katedra Histologii, Uniwersytet Jagielloński, Collegium Medicum, Kraków (rozdział 15)

Prof. dr hab. Jacek Malejczyk
Katedra i Zakład Histologii i Embriologii, Centrum Biostruktury Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, Warszawa (rozdział 10)

Dr n. med. Agnieszka Malińska
Katedra i Zakład Histologii i Embriologii, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, (rozdział 12)

Prof. dr hab. Stanisław Moskalewski
Katedra i Zakład Histologii i Embriologii, Centrum Biostruktury Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, Warszawa (rozdział 8)

Prof. dr hab. Michał Nowicki
Katedra i Zakład Histologii i Embriologii, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu (rozdział 14)

Prof. dr hab. Stanisław Orkisz
Uniwersytet Medyczny w Łodzi, Katedra Biostruktury (rozdział 1)

Dr hab. Tadeusz Pacuszka
Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego; Studium Kliniczno-Dydaktyczne; Zakład Biochemii i Biologii Molekularnej, Warszawa (rozdział 6)

Dr hab. Małgorzata Piasecka
Katedra i Zakład Histologii i Biologii Rozrodu, Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie (rozdział 9)

Dr hab. Marzenna Podhorska-Okołów, prof. nadzw.
Katedra i Zakład Histologii i Embriologii, Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu (rozdział 14)

Prof. dr hab. Wojciech Sawicki
Katedra i Zakład Histologii i Embriologii, Centrum Biostruktury Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, Warszawa, profesor emerytowany (rozdział 3)

Prof. dr hab. Cezary Wójcik
Oregon Health and Science University, USA, (rozdział 4, 8)

Prof. dr hab. n. med. Maciej Zabel
Katedra i Zakład Histologii i Embriologii, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu (rozdział 5, 7, 11, 13)

Ryciny – mgr inż. Monika Świerczewska

Miary oraz skróty aminokwasów używane w biologii komórki

Długość	metr (m)	
	centymetr (cm)	
	milimetr (mm)	
	mikrometr (μm)	
	nanometr (nm)	
	pikometr (pm)	
	Ångström (Å)	
Objętość	litr (l)	
	mililitr (ml)	
	mikrolitr (μl)	
	nanolitr (nl)	
	pikolitr (pl)	
Masa	kilogram (kg)	
	gram (g)	
	miligram (mg)	
	mikrogram (μg)	
	nanogram (ng)	
	pikogram (pg)	
Masa cząsteczkowa	dalton (d)	1 d = masa zbliżona do masy atomu wodoru ($1{,}66 \times 10^{-24}$ g)
	kilodalton (kd)	1 kd = 10^3 d
Długość cząsteczki	kilobase (kb)	1 kb = 1000 par zasad dwuniciowego albo jednoniciowego kwasu nukleinowego
	megabase (Mb)	1 Mb = 10^3 kb

AMINOKWASY					
Aminokwasy	skrót trójliterowy	skrót jednoliterowy	Aminokwasy	skrót trójliterowy	skrót jednoliterowy
Alanine	Ala	A	Leucine	Leu	L
Arginine	Arg	R	Lysine	Lys	K
Asparagine	Asn	N	Methionine	Met	M
Aspartic acid	Asp	D	Phenylalanine	Phe	F
Cysteine	Cys	C	Proline	Pro	P
Glutamic acid	Glu	E	Serine	Ser	S
Glutamine	Gln	Q	Threonine	Thr	T
Glycine	Gly	G	Tryptophan	Trp	W
Histidine	His	H	Tyrosine	Tyr	Y
Isoleucine	Ile	I	Valine	Val	V

Wykaz skrótów

ABC motyw – *ATP-binding cassette*, motyw wiążący ATP
ABP – *actin binding proteins*, białka wiążące aktynę
ACh – *acetylocholine*, acetylocholina
AChE – *acetylocholine esterase*, esteraza acetylocholinowa
ADCC – *antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*, cytotoksyczność zależna od przeciwciał
AGT – *alanine-glyoxal aminotransferase*, aminotransferaza alaninowo-glioksalowa
AIF – *apoptosis inducing factor*, czynnik indukujący apoptozę
ANT – *adenine nucleotide transclocase*, translokaza adeniny
APAF – *apoptosis protease activating factor*, czynnik aktywujący proteazy apoptozy
APC – *adenomatous polyposis coli*, gruczolakowata polipowatość jelita grubego
APC – *anaphase promoting complex*, kompleks promujący anafazę
APC – *antigen presenting cells*, komórki prezentujące antygen
AspAT – *aspartate aminotransferase*, aminotransferaza asparaginianowa

BMP – *bone morphogenetic protein*, białko morfogenetyczne kości
BrdU – *bromodeoxyuridine*, bromodeoksyurydyna

C (np. C2, C3, C4) – *complement component*, składnik dopełniacza
CAD – *caspase activated DNAse*, DNA-za aktywowana kaspazą
CAM – *cell adhesion molecule*, cząsteczka adhezji komórkowej
CARD – *caspase recruitment domains*, domeny rekrutacji kaspaz
CB – *coiled bodies*, ciałka zwinięte
CBP – *cap binding protein*, białko wiążące się z „czapeczką" w mRNA
CD (np. CD45) – *cluster of differentiation*, kompleks różnicowania
CDC – *cell-division control*, kontrola podziału komórki
CDK (np. CDK4) – *cyclin dependent kinases*, kinazy zależne od cyklin
CDR – *complementary determining regions*, regiony determinujące dopasowanie
CER – *ceruloplasmin*, ceruloplazmina
CKI – *cyclin kinase inhibitors*, inhibitory CDK
CLIP – *class II associated invariant peptide*, niezmienny peptyd związany z kompleksem MHC klasy II
CML – *chronic myeloid leukaemia*, przewlekła białaczka szpikowa
COP – *coat protein*, białko opłaszczające
CRD – *carbohydrate-recognition-domain*, domeny rozpoznające cukry
CRP – *C reactive protein*, białko C reaktywne
CTL – *cytolytic T lymphocyte*, cytolityczny limfocyt T

DA – *dopamine*, dopamina
dCK – *deoxycytidine kinase*, kinaza deoksycytydyny
DD – *death domain*, domena śmierci
DED – *death effector domains*, efektorowa domena śmierci
DFC – *dense fibrillar component*, gęsty składnik włóknisty (jąderka)
DG – *diacylglycerol*, diacyloglicerol
DHFR – *dihydrofololate reductase*, reduktaza dihydrofolianowa
DKG – dehydrogenaza a–ketoglutaranu
DNA/DMB – geny kodujące białka zaangażowane w prezentację peptydów w asocjacji z cząsteczkami MHC klasy II

DNP – *deoxyrybonucleoprotein*, deoksyrybonukleoproteina
DR – *death receptor*, receptor śmierci

E2F – czynnik transkrypcyjny
EBP – *elastin binding protein*, białko wiążące elastynę
EBV – *Epstein-Barr virus*, wirus Epstein-Barr
ECM – *extracellular matrix*, substancja międzykomórkowa
EDTA – *ethylenediaminetetraacetic acid*, etylenodiaminotetraoctan
EGF – *epidermal growth factor*, naskórkowy czynnik wzrostu
EGF-R – *epidermal growth factor receptor*, receptor naskórkowego czynnika wzrostu
ES – *embryonic stem cells*, komórki macierzyste
ESP – *exciatory postsynaptic potencial*, postsynaptyczny potencjał pobudzający
ETF – *electron transfer protein*, białko przenoszące elektrony
ETS – *external transcribed spacer*, zewnętrzna sekwencja podlegająca transkrypcji

FC – *fibrillar centers*, ośrodki włókniste (jąderka)
FGF – *fibroblast growth factor*, czynnik wzrostu fibroblastów
FIF – *formaldehyde induced fluorescence*, fluorescencja indukowana formaldehydem
FISH – *fluorescence in situ hybridization*, fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ*
FR – *framework regions*, regiony zrębowe
Fab – *fragment antigen binding*, fragment wiążący antygen
Fas-L – *FAS ligand*, ligand receptora FAS
Fc – *crystalizable fragment*, fragment krystalizujący
FcεRI – *Fc immunoglobulin E receptor*, receptory dla fragmentu Fc immunoglobuliny E
FcγRI – *Fc immunoglobulin G receptor*, receptory dla fragmentu Fc immunolobuliny G

GAG – *glycosoaminoglycan*, glikozaminoglikan
GATA-3 – białko regulujące ekspresję genu interleukiny-4
GC – *granular component*, składnik ziarnisty (jąderka)
GFAP – *glial fibrillary acidic protein*, kwaśne włókniste białko gleju
GFP – *green fluorescent protein*, zielono fluoryzujące białko
GLUT – *glucose transporter*, transporter glukozy
GPI – *glycosyl phosphatidyl inositol*, glikozylofosfatydyloinozytol

HAP – *haptoglobin*, haptoglobina
HBV – *hepatitis B virus*, wirus zapalenia wątroby B
HLA – *human leucocyte antigens*, układ antygenów leukocytarnych człowieka
HMG–CoA – *3-hydroxy-3-methyl-glutaryl coenzyme A*, 3-hydroksy-3metylo-glutarylo koenzym A
HMW–MAP – *high molecular weight – microtubule associated proteins*, wysokocząsteczkowe białka towarzyszące mikrotubulom
hnRNA – *heterogeneous nuclear RNA*, niejednorodny jądrowy RNA (heterogenny RNA)
HPV – *human papilloma virus*, ludzki wirus papilloma
HUGO – *Human Genome Organization*, Organizacja Poznania Ludzkiego Genomu
Hsp (np. Hsp70) – *heat shock protein*, białko szoku cieplnego
5–HT – *serotonine*, serotonina

IAP – *inhibitor of apoptosis*, inhibitor apoptozy
ICAD – *inhibitor of caspase-activated DNAse*, inhibitor DNA-zy aktywowanej kaspazą
ICAM – *intercellular adhesion molecule*, cząsteczka adhezji międzykomórkowej
ICE – *interleukin-1 converting enzyme*, enzym konwertujący interleukinę 1
IF – *interchromatin fibril*, włókno interchromatyny
IFAP – *intermediate filament associated protein*, białko towarzyszące filamentów pośrednich
IFN (np. IFN-γ) – *interferon*, interferon

IG – *interchromatin granules*, ziarnistość interchromatyny
IGF (np. IGF-2) – *insulin-like growth factor*, isulinopodobny czynnik wzrostu
IL – interleukina, np. IL-1
INK4 – *inhibitor of CDK4*, inhibitor CDK4
IP-10 – *interferon-inducible protein*, białko indukowane przez interferon
IP_3 – *inositol triphosphate*, trifosforan inozytolu
IPSP – *inhibitor postsynaptic potencial*, postsynaptyczny potencjał hamujący
ITS – *internal transcribed spacer*, wewnętrzna sekwencja transkrybowana
Ig (np. IgG) – *immunoglobulin*, immunoglobulina (przeciwciało)
IgCAM – *immunoglobulin-like adhesion molecule*, cząsteczki adhezyjne z nadrodziny immunoglobulin
Ii – *inwariant chain*, łańcuch niezmienny

JAK – *Janus activated kinase*, kinaza aktywowana zielenią Janusową

KIR – *killer cell inhibiory receptors*, receptory hamujące aktywność cytotoksyczn
Kd – *dissociation constant*, stała dysocjacji

LCA – *leukocyte common antigen*, wspólny antygen leukocytów
LDSV – *large dense core vesicle*, duży elektronowogęsty pęcherzyk synaptyczny
LGL – *large granular lymphocytes*, duże ziarniste limfocyty
LMP – *large multifunctional protease*, duża wielofunkcyjna proteaza
LMW–MAP – *low molecular weight – microtubule associated proteins*, niskocząsteczkowe białka towarzyszące mikrotubulom
LOH – *loss of heterozygosity*, utrata heterozygotyczności

M1 – makrofagi stymulujące układ TH1
M2 – makrofagi stymulujące układ TH2
MAGP – *microfibrils associated glycoprotein*, glikoproteiny związane z mikrofibrylami

MAM – *mitochondrion-associated ER-like membranes*, związane z mitochondriami błony podobne do siateczki śródplazmatycznej
MAP – *microtubule associated proteins*, białka towarzyszące mikrotubulom
MAP – *mitogen-activated protein*, białko aktywowane mitogenem
MAPK – *mitogen-activated protein kinase*, MAP kinase, kinaza MAP
MDM2 – *murine double minute 2*, protoonkogen na małym, podwójnym chromosomie mysim
MDR – *multidrug resistance*, oporność wielolekowa
MEN – *mitotic exit network*, białka wyjścia z mitozy
m7G – *methylo-7-guanosine*, metylo-7-guanozyna
MHC – *major histocompatibility complex*, główny układ zgodności tkankowej
MIG – *monokine-induced by γ interferon*, monokina indukowana przez interteron γ
MPF – *M phase factor*, czynnik fazy M
MPF – *maturation-promoting factor*, czynnik wywołujący dojrzewanie
MRP – *multidrug resistace protein*, białko oporności wielolekowej
MSF – *mitochondrial import stimulating factor*, czynnik stymulujący import do mitochondriów
mtDNA – *mitochondrial DNA*, mitochondrialny DNA
MTOC – *microtubules organizing renter*, centrum nukleacji mikrotubul
MTS – *mitochondrial targeting sequence*, mitochondrialna sekwencja sygnałowa

NA – *noradrenaline*, noradrenalina
NAD – *nicotinamide-adenine dinucleotide*, dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy

NADH – *reduced NAD*, zredukowany NAD
NB – *nuclear bodies*, ciałka jądrowe
NES – *nuclear export signal*, jądrowy sygnał eksportowy
NFAT – *nuclear factor of activated T cells*, czynnik jądrowy aktywowanych limfocytów T
NFκB – *nuclear factor κB*, czynnik jądrowy κB
NGF – *nerve growth factor*, czynnik wzrostu nerwów
NHP – *nonhistone chromatin protein*, białko niehistonowe chromatyny
NK – *natural killer*, komórka cytotoksyczna (naturalny zabójca)
NLS – *nuclear localization signal*, sygnał warunkujący import do jądra
NO – *nitric oxide*, tlenek azotu
NOR – *nucleolus organizing region*, region organizatorowy jąderka
NOS – *nucleolar targeting signal*, jąderkowa sekwencja sygnałowa

OSCP – *oligomycin sensitive confering protein*, białko nadające wrażliwość na oligomycynę

p – *protein*, białko (np. p53, p21)
PAF – *platelet activating factor*, czynnik aktywujący płytki
PARP – *poly-ADP-ribose polymarease*, polimeraza poli-ADP-rybozy
PBR – *peripheral benzodiazepine receptor*, receptor benzodiazepiny
PCNA – *proliferating cell nuclear antigen*, antygen jądrowy komórki proliferującej (cyklina)
PCNA – *proliferating cell nuclear antigen*, antygen komórek proliferujących
PCR – *polymerase chain reaction*, reakcja łańcuchowa polimerazy
PF – *perichromatin fibril*, włókno perychromatyny
PG – *perichromatin granule*, ziarnistość perychromatyny
P-glikoproteina – *p-glycoprotein*, glikoproteina P odpowiedzialna za MDR
PI–3K – *phosphatidyl inositol-3-kinase*, kinaza fosfatydylo 3-inozytolu
PLA (np. PLA_2) – *phospholipase A*, fosfolipaza A
PLC (np. PLCγ) – *phospholipase C*, fosfolipaza C
pre-mRNA – *precursor messenger RNA*, prekursor informacyjnego RNA
PTS – *peroxisomal targeting sequence*, peroksyzomalna sekwencja sygnałowa
Pnt – *pair of nucleotides*, para nukleotydów

RB – *retinoblastoma protein*, białko retinoblastoma
rDNA – *ribosomal deoxyrybonucleic acid*, rybosomalny DNA (sekwencje DNA kodujące rRNA)
RFC – *replication factor C*, czynnik replikacyjny C
RNP – *rybonucleoprotein*, rybonukleoproteina
RNR – *ribonucleotide reductase*, reduktaza rybonukleotydowa
rRNA – *ribosomal rybonucleic acid*, rybosomalny kwas rybonukleinowy
RT-PCR – *reverse transcriptase PCR*, odwrotna transkryptaza PCR
RasK – *Kirsten murine sarcoma*, onkoproteina w mięsaku Kirstena

SDS – *sodium dodecyl sulphate*, dodecylosiarczan sodu
SDS–PAGE – *sodium dodecyl sulphate – polyacrylamide gel electrophoresis*, dodecylosiarczan sodu – elektroforeza na żelu poliakrylamidowym
SNAP (np. SNAP-25) – *soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein (synaptosomal-associated protein, soluble NSF attachment protein)*
SNARE – *soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein receptor (receptor for SNAP)*
snRNA – *small nuclear RNA*, mały jądrowy RNA (niskocząsteczkowy RNA)
snRNP – *small nuclear ribonucleoprotein*, mała jądrowa nukleoproteina
SRP – *signal recognition particle*, cząstka rozpoznająca sygnał
SSB – *single strand binding*, białko SBB (białko wiążące się z pojedynczymi łańcuchami DNA)
SSV – *small synaptic vesicle*, mały pęcherzyk synaptyczny

STAT – *signal transducers and activator of transcription*, transduktory sygnału i aktywatory transkrypcji
STAT – *signal transducers and activators of transcription*, białka STAT
Shh – *sonic hedgehog protein*, białko Shh

T-bet – *T-box expressed in T cells*, czynnik transkrypcyjny komórek T regulujący produkcję INF-γ
TC limfocyt – *T cytotoxic lymphocytes*, limfocyt cytotoksyczny
TCR – *T cell receptor*, receptor limfocytów T
TCR1 – *T cell receptor 1*, receptor limfocytów T zbudowany z łańcuchów γ i δ
TCR2 – *T cell receptor 2*, receptor limfocytów T zbudowany z łańcuchów α i β
TF (np. TFIIB) – *transcription factor*, czynnik transkrypcyjny
TGF – *transforming (tumor) growth factor*, transformujący czynnik wzrostu (nowotworu)
TGF β – *transforming growth factor β*, transformujacy czynnik wzrostu β
TH limfocyt – *T helper lymphocytes*, limfocyt pomocniczy
TIM – *transport across the inner membrane*, transport przez błonę wewnętrzną
TK – *thymidine kinase*, kinaza tymidyny
TNF – *tumor necrosis factor*, czynnik martwicy nowotworów
TOM – *transport across the outer membrane*, transport przez błonę zewnętrzną
TUNEL – *terminal deoxynucleotidyl transferase dependent nick end labeling*, znakowanie przy użyciu transferazy deoksynukleotydowej
Tαβ – limfocyt T z receptorem zbudowanym z łańcuchów α i β
TdT – *terminal deoxynucleotidyl transferase*, transferaza nukleotydów
Tγδ – limfocyt T z receptorem zbudowanym z łańcuchów γ i δ
t–SNARE – *membrane receptor for SNAP (target receptor for SNAP)*, receptor błonowy dla SNAP (docelowy receptor SNAP)

UBF – *UCE-binding factor*, czynnik białkowy wiążący UCE w DNA
UCE – *upstream control element*, element kontrolny DNA położony przed genem

VCAVI – *vascular cell adhesion molecule*, cząsteczka adhezji komórkowej naczyń
VDAC – *voltage dependent anion selective channel*, kanały selektywne dla anionów zależne od napięcia
VIP – *vasoactive intestinal peptide*, naczynioaktywny peptyd jelitowy
VKR – *natural killer receptor*, receptor stymulujący aktywność cytotoksyczną
v–SNARE – *vesicle-SNARE (vesicle receptor for SNAP)*, receptor pęcherzyka przenoszącego dla białka SNAP (pęcherzykowy receptor SNAP)

ROZDZIAŁ 11

Cząsteczki adhezyjne i składnik substancji międzykomórkowej 231

Maciej Zabel, Jerzy Kawiak

Cząsteczki adhezyjne 232 / Białka wewnątrzkomórkowe związane z CAM 237 / Białka połączone z integrynami 238 / Cząsteczki międzykomórkowe 238 / Błona podstawna 245 / Połączenia międzykomórkowe 247 / Znaczenie CAM w fizjologii i patologii 251

ROZDZIAŁ 12

Podstawy immunologii 257

Agnieszka Malińska, Ewa Jagoda

Mechanizmy odporności wrodzonej (nieswoistej) 259 / Bariery fizyczne i chemiczne 259 / Czynniki humoralne (regulatory odporności wrodzonej) 259 / Komórki 262 / Mechanizmy odporności nabytej (swoistej) 267 / Odpowiedź komórkowa 267 / Odpowiedź humoralna 277 / Pamięć immunologiczna 280 / Recyrkulacja limfocytów 280 / Regulacja odpowiedzi immunologicznej 281 / Rola antygenu 281 / Regulacja na poziomie genów 281 / Regulacja neuroendokrynowa 281 / Przykłady chorób immunizacyjnych 282 / Deficyty immunologiczne 282 / Choroby autoimmunizacyjne 284

ROZDZIAŁ 13

Kancerogeneza 287

Jerzy Kawiak, Maciej Zabel

Podstawowe zaburzenia w komórce nowotworowej 288 / Brak obrony immunologicznej przeciw nowotworowi, tolerancja immunologiczna 288 / Klonalny rozwój nowotworu 289 / Nowotwory łagodne i złośliwe 290 / Onkogeny, onkogeny wirusowe 290 / Powstawanie onkogenów w komórkach niezakażonych retrowirusem 290 / Geny supresorowe nowotworów 292 / Telomery 296 / Przykład rozwoju nowotworu złośliwego 296 / Brak obrony immunologicznej przeciw nowotworowi – tolerancja immunologiczna 296 / Leczenie nowotworów 299

ROZDZIAŁ 14

Śródbłonek 301

Piotr Dzięgiel, Michał Nowicki, Marzenna Podhorska-Okołów

Ogólna charakterystyka komórek śródbłonka 302 / Regeneracja śródbłonka 304 / Dysfunkcja komórek śródbłonka a choroby układu krążenia 304 / Rola śródbłonka w procesie angiogenezy 306 / Rola śródbłonka w chorobach nowotworowych 307

ROZDZIAŁ 15

Metody badań budowy i funkcji komórek 311

Jan A. Litwin

Wstęp 312 / Metody przygotowania komórek do badań 312 / Homogenizacja i frakcjonowanie komórek 313 / Hodowla komórek 314 / Przygotowanie komórek do badań *in situ* 315 / Elektroforeza białek i kwasów nukleinowych 315 Identyfikacja rozdzielonych białek i kwasów nukleinowych 316 / Manipulowanie DNA 319 / Sekwencjonowanie DNA 319 / Hybrydyzacja kwasów nukleinowych 320 / Badania mikroskopowe 321 / Mikroskopy świetlne 321 / Mikroskopy elektronowe 324 / Specjalne metody stosowane w mikroskopii elektronowej 326 / Cytochemia klasyczna i cytochemia enzymów 327 / Immunocytochemia 328 / Hybrydocytochemia 330 / Znaczniki i wskaźniki wprowadzane do żywych komórek 330 / Metoda FRET 331 / Genetyczne znakowanie białek 331 / Autoradiografia 332 / Cytometria przepływowa 333 / Cyfrowe metody rejestracji i przekształcania obrazu mikroskopowego 334

HASŁA 335

Skorowidz 359

ROZDZIAŁ 1

Organizacja i funkcjonowanie jądra komórkowego

Stanisław Orkisz, Hieronim Bartel

HASŁA

Otoczka jądrowa

Nukleoplazmę od cytoplazmy oddziela otoczka jądrowa, która jest dynamiczną strukturą przystosowaną do intensywnej wymiany jądrowo-cytoplazmatycznej. Odbywa się ona przez kanały w otoczce, w których zlokalizowane są wyspecjalizowane struktury zwane jądrowymi kompleksami porowymi.

Składniki DNA

Nośnik informacji genetycznej – DNA, jest zbudowany z nukleotydów. Szkielet łańcucha stanowi cukier deoksyryboza połączona z grupą fosforanową. Trzeci składnik DNA stanowi jedna z 4 zasad: dwóch purynowych (adeniny i guaniny) i 2 pirymidynowych (cytozyny i tyminy). Sekwencja zasad decyduje o zapisie informacji genetycznej. W dwuniciowej helisie zasady obu łańcuchów łączą się zgodnie z regułą komplementarności: adenina z tyminą, a guanina z cytozyną.

Struktura DNA

Łańcuchy polinukleotydowe skręcone są w prawoskrętną, dwuniciową helisę o średnicy 2 nm. Jeden skręt helisy o długości 3,4 nm zawiera 10 par nukleotydów. Jest to najczęściej występująca forma przestrzenna DNA określana jako DNA B. Plastyczność DNA sprawia, że może on tworzyć lewoskrętną helisę zwaną DNA Z, o nieco mniejszej średnicy i zygzakowatym kształcie szkieletu fosforanowo-cukrowego. Niekiedy DNA formuje się w konfigurację DNA A o największej średnicy.

Replikacja DNA

Powielanie DNA jest złożonym, wieloetapowym, wieloenzymatycznym procesem, w którym uczestniczą helikazy – enzymy rozplatające podwójną helisę, SSB – białka stabilizujące jednoniciowy DNA, prymazy – rozpoczynające replikację, białka ruchomej obręczy, umożliwiające polimerazie DNA polimeryzację nukleotydów w nowo powstającym łańcuchu polinukleotydowym. W tym bardzo dokładnym mechanizmie zdarzają się błędne sparowania nukleotydów, które są korygowane podczas procesu zwanego redagowaniem.

Naprawa DNA

Mechanizmy naprawy DNA zapewniają wierność replikacji oraz stabilność genomu. Błędy w sekwencji DNA, występujące bardzo rzadko w czasie replikacji, są natychmiast usuwane przez aparat replikacyjny. Nierozpoznane i nieusunięte defekty struktury DNA prowadzą do powstania mutacji.

Skład i struktura chromatyny

Cząsteczka DNA w chromatynie, łącząc się z białkiem, tworzy kompleks – włókno deoksyrybonukleoproteinowe (DNP). Głównym składnikiem

białkowym chromatyny są 4 klasy histonów: H2A, H2B, H3 i H4. Histon H1 różni się od histonów rdzeniowych i pełni inną funkcję. Białka niehistonowe (NHP) są zaangażowane w replikację i naprawę DNA oraz ekspresję genów. Podstawową strukturą chromatyny jest włókno nukleosomowe (nukleofilament) składające się z nukleosomów oraz tzw. łącznikowego DNA. Strukturę wyższego rzędu chromatyny interfazalnej tworzy solenoid, powstały w wyniku superspiralizacji włókna nukleosomowego. W wyniku dalszej kondensacji chromatyny powstają duże pętle liczące 60–100 kpz, zakotwiczone w macierzy jądrowej.

Przestrzeń interchromatynowa

Przestrzeń ograniczona otoczką jądrową między przylegającymi do niej i rozrzuconymi w nukleoplazmie skupieniami chromatyny skondensowanej. Zawiera wiele struktur ziarnistych i włóknistych o rybonukleoproteinowym składzie oraz chromatynę rozproszoną (euchromatynę).

Pozajądrowe struktury RNP

Struktury RNP przestrzeni interchromatynowej są morfologicznym wykładnikiem transkrypcji, metabolizmu i transportu kwasów nukleinowych oraz syntezy białek. W strefie brzeżnej chromatyny skondensowanej wyróżnia się włókna i ziarna perychromatyny odnoszące się do transkrypcji i formowania mRNA. Ponadto kontrastowanie preferencyjne z EDTA, różnicujące struktury zawierające DNA i RNA, pozwala uwidocznić w przestrzeni interchromatynowej włókna i ziarna interchromatyny, a także niejednolitą grupę struktur o niezupełnie poznanej biogenezie i funkcji – ciałka jądrowe.

Jąderko – struktura i funkcje

Jąderka są aktywnymi domenami jądra komórkowego związanymi z syntezą prekursorów rybosomów. Podstawowe ich składniki to: ośrodki włókniste, gęsty składnik włóknisty, składnik ziarnisty, chromatyna związana z jąderkiem oraz wakuole jąderkowe. Ze względu na rozmieszczenie oraz proporcje składników jąderka można wyróżnić kilka typów morfologiczno-czynnościowych jąderek. Wysoką aktywność transkrypcyjną reprezentują jąderka gąbczaste i zwarte. Jąderka z segregacją składników oraz jąderka resztkowe są morfologicznym wyrazem zahamowania syntezy rRNA.

Transkrypcja RNA

Jest to proces przepisywania informacji zapisanej w kolejności nukleotydów DNA na sekwencję nukleotydów w łańcuchu mRNA lub rRNA. Transkrypcja jest procesem wieloetapowym, w wyniku którego powstaje pierwotny transkrypt – pre-mRNA lub pre-rRNA. W procesie dojrzewania RNA (ang. *splicing*) uczestniczą liczne białka oraz niskocząsteczkowe RNA.

Struktura rDNA

Wspólna jednostka transkrypcyjna genu rDNA zawiera 3 rodzaje sekwencji nukleotydowych: sekwencje przepisywane i obecne w dojrzałych rRNA, sekwencje rozdzielające poszczególne jednostki matrycowe w tandemach oraz sekwencje transkrybowane i obecne w pierwotnym transkrypcie, które zostają wycięte w czasie dojrzewania pre-rRNA. Sekwencje regulujące funkcję rDNA leżą w obrębie sekwencji nieprzepisywanych.

Morfologia rybosomowych kompleksów transkrypcyjnych

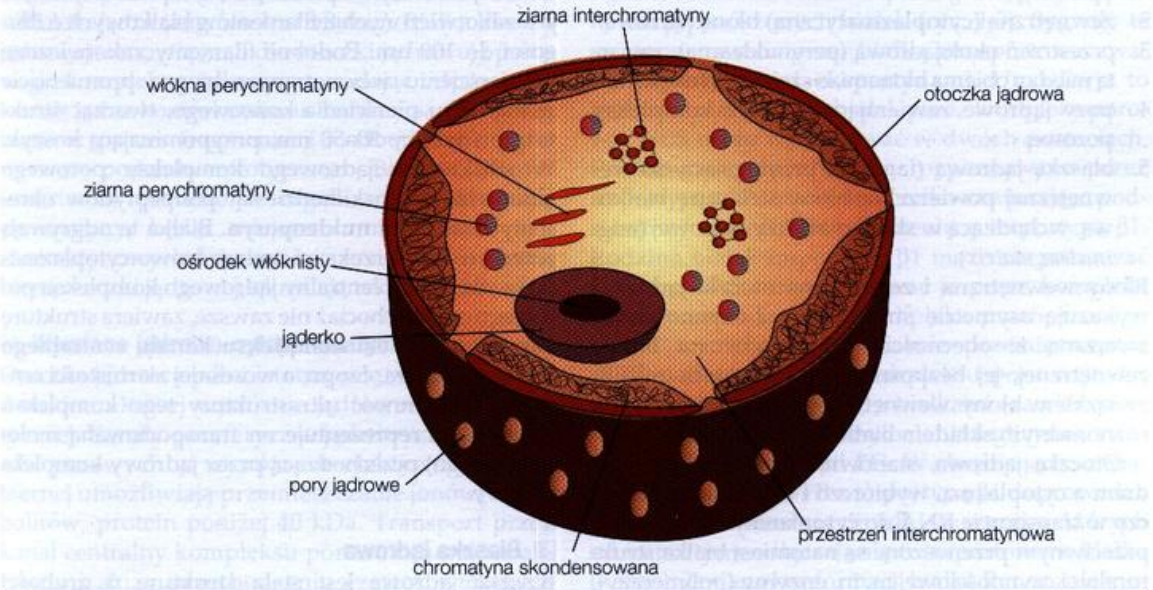
Aktywne geny rybosomowe widoczne są po zupełnym rozproszeniu chromatyny w postaci „choinek". Często ułożone są parami rozdzielonymi przez sekwencje nieprzepisywane. Włókna DNA są gęsto pokryte wzrastającymi w kierunku transkrypcji łańcuchami transkryptów, u podstawy których znajdują się cząsteczki Pol i RNA.

Skład i struktura RNA

Jednoniciowy pofałdowany przestrzennie RNA różni się od cząsteczki DNA obecnością w swoim składzie rybozy zamiast deoksyrybozy oraz uracylu zamiast tyminy.

Jądro komórkowe – dane ogólne

Jądro komórkowe zostało opisane w końcu XVII w., ale dopiero Robert Brown w 1831 r. nadał mu nazwę ***nucleus***. Jądro komórkowe jest przedziałem komórki eukariotycznej, w którym jest zgromadzona prawie cała informacja genetyczna (99% genomu jest zawarte w jądrze, resztę stanowi mitochondrialny DNA). Dzięki temu jądro kontroluje najważniejsze funkcje komórki: replikację DNA i proces transkrypcji. Wielkość jądra, jego kształt, a także organizacja materiału genetycznego zależą przede wszystkim od stanu czynnościowego i typu komórki. W komórkach młodych, intensywnie proliferujących, o dużej aktywności metabolicznej znajdują się duże kuliste jądra z wyraźnym jąderkiem i chromatyną rozproszoną. W komórkach dojrzałych jądra przyjmują mniej regularne kształty. W komórkach starych o małej aktywności metabolicznej zmianom kształtu jądra towarzyszy kondensacja (***karyopyknosis***) lub fragmentacja (***karyorhexis***) chromatyny. Zmiany te są spostrzegane także w różnych stanach chorobowych. Kształt i wielkość jądra zmieniają się również w poszczególnych fazach cyklu komórkowego. Kuliste i niewielkich rozmiarów jądra widoczne w fazie G1, z chwilą przejścia w fazę G2 zwiększają swoje rozmiary, przyjmując mniej regularne kształty. Średnica większości jąder mieści się w przedziale 3,5–20 μm. Jądro jest stałym elementem wszystkich komórek organizmu z wyjątkiem dojrzałych krwinek czerwonych u ssaków i człowieka oraz warstwy rogowej naskórka. Większość komórek ma jedno jądro (monokariocyty). Rzadziej obserwuje się komórki dwujądrzaste (bikariocyty, np. hepatocyty) lub wielojądrzaste (polikariocyty), których przykładem są osteoklasty. Liczne badania struktury jądra dostarczały wciąż nowych informacji, ale obecność dużych skupień chromatyny skondensowanej, nawet w erze mikroskopii elektronowej, skutecznie maskowała organizację przestrzenną jądra komórkowego. Jeszcze w 1977 r. wyróżniano 4 elementy struktury jądra: otoczkę, heterochromatynę, jąderko oraz przestrzeń między skupieniami chromatyny – interchromatynę. Wprowadzenie do badań ultrastruktury jądra wielu technik, takich jak: kontrastowanie z EDTA, autoradiografia wysokorozdzielcza, technika rozpraszania chromatyny do uwidocznienia kompleksów transkrypcyjnych, metody ultracytochemiczne, technika hybrydyzacji *in situ*, cytometria przepływowa, umożliwiło lokalizację procesów replikacji, transkrypcji, dojrzewania i transportu różnych typów RNA w przestrzeni interchromatynowej. Chociaż funkcja i znaczenie biologiczne wielu struktur jądrowych są wciąż nie do końca wyjaśnione, to w ultrastrukturze jądra interfazalnego można wyróżnić strefy (domeny), którym przypisywane są określone funkcje (ryc. 1.1).



Rycina 1.1 Budowa jądra komórkowego. (zmodyfikowane wg B. Alberts).

Są to:
1. otoczka jądrowa,
2. macierz jądrowa,
3. chromatyna skondensowana (heterochromatyna),
4. chromatyna rozproszona (euchromatyna),
5. jąderka,
6. strefa perychromatyny:
   a. ziarna perychromatyny,
   b. włókna perychromatyny,
7. strefa interchromatyny:
   a. ziarna interchromatyny,
   b. włókna interchromatyny,
8. ciałka jądrowe.

Otoczka jądrowa

Otoczka jądrowa jest dynamiczną i asymetryczną strukturą oddzielającą zawartość nukleoplazmy jądra komórkowego od cytoplazmy. Otoczka zanika w późnej profazie, rozpadając się na pęcherzyki, a odtworzeniu ulega z udziałem siateczki sarkoplazmatycznej w telofazie. W przeciwieństwie do błony komórkowej, przekazywanie i wymiana jądrowo-cytoplazmatyczna odbywa się w ściśle określonych miejscach zwanych ***porami jądrowymi*** (nukleoporami) z udziałem złożonych strukturalnie ***jądrowych kompleksów porowych*** (ang. *NPC, nuclear pore complex*). W obrębie otoczki jądrowej wyróżnia się:
1. wewnętrzną błonę jądrową od strony nukleoplazmy,
2. zewnętrzną (cytoplazmatyczną) błonę jądrową,
3. przestrzeń okołojądrową (perynuklearną), zawartą między obiema błonami, o szerokości ok. 40 nm,
4. pory jądrowe zawierające jądrowe kompleksy porowe,
5. blaszkę jądrową (lamina), przylegającą do wewnętrznej powierzchni błony strukturę białkową, wchodzącą w skład macierzy jądrowej (ang. *nuclear matrix*).

Błony wewnętrzna i zewnętrzna otoczki jądrowej wykazują asymetrię strukturalną i czynnościową związaną z: obecnością rybosomów na błonie zewnętrznej, jej bezpośrednim kontaktem z RER, związkiem błony wewnętrznej z blaszką jądrową, różnorodnym składem białkowym obu błon.

Otoczka jądrowa, stanowiąc barierę między jądrem a cytoplazmą, wybiórczo i aktywnie uczestniczy w transporcie RNA do cytoplazmy. W kierunku przeciwnym przenoszone są natomiast białka strukturalne i czynnościowe, m. in. enzymy (polimerazy), czynniki transkrypcyjne, niskocząsteczkowe RNA.

Jądrowy kompleks porowy

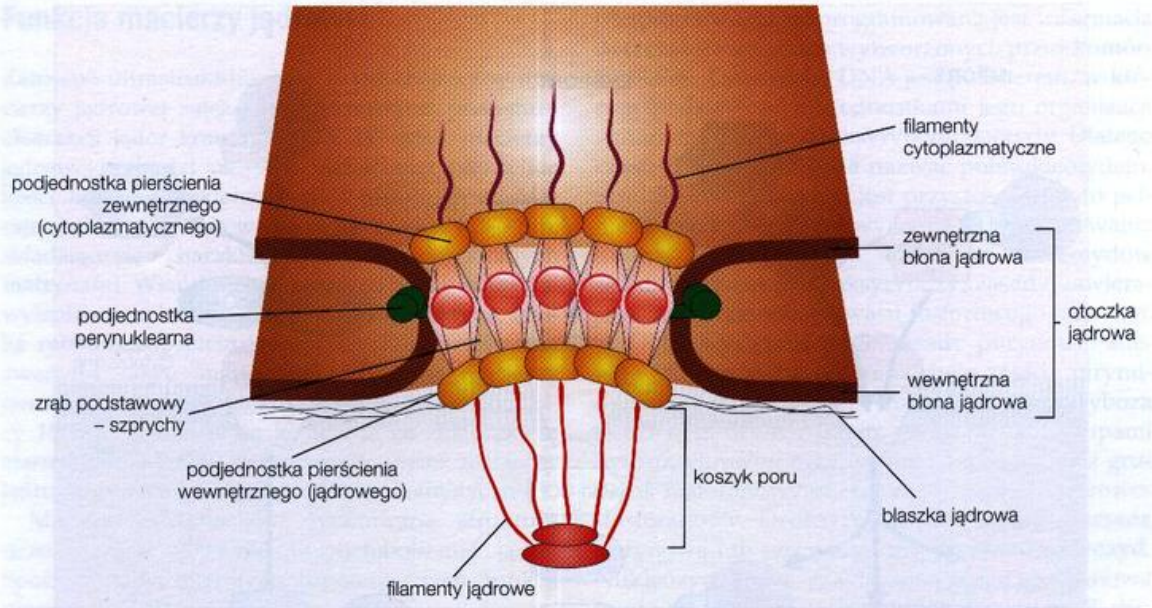
Jądrowy kompleks porowy jest wyspecjalizowaną strukturą osadzoną w obrębie poru jądrowego o średnicy 120–150 nm. Liczba kompleksów porowych w otoczce jądra komórkowego zależy od wieku, aktywności metabolicznej oraz typu komórki. Przeciętnie w komórkach eukariotycznych znajduje się 10–20 porów/mm^2, co w hepatocytach stanowi 3000–7000 porów. W otoczce jądrowej komórek o wysokiej aktywności metabolicznej ich liczba może sięgać aż 50 mln.

Każdy kompleks porowy (ryc. 1.2) jest złożoną cylindryczną strukturą białkową o kształcie oktagonalnym. Cylinder ten tworzą 3 współosiowo ułożone pierścienie:
1. pierścień cytoplazmatyczny – od strony blaszki zewnętrznej otoczki jądrowej,
2. pierścień jądrowy od strony nukleoplazmy,
3. kompleks 8 promieniście wpuklających się do kanału segmentów (zrąb podstawowy) przypominających szprychy koła, tworzących kompleks kanału centralnego.

Jądrowy kompleks porowy jest zakotwiczony w otoczce jądrowej przez jedną z czterech podjednostek, z których jest zbudowana każda ze szprych zrębu podstawowego. Ułożenie podjednostek sąsiadujących szprych sprawia, iż między leżącymi obok siebie szprychami a błoną otoczki jądrowej powstaje 8 kanałów peryferycznych (obwodowych) o średnicy 10 nm. Kanały te przypuszczalnie są miejscem dyfuzji biernej jonów i cząsteczek o niewielkiej średnicy. W pierścieniu cytoplazmatycznym jest zakotwiczonych 8 filamentów białkowych o długości do 100 nm. Podobne filamenty zakotwiczone w pierścieniu wewnętrznym biegną promieniście w kierunku pierścienia końcowego, tworząc strukturę o średnicy 30–50 nm, przypominającą koszyk. W strukturach jądrowego kompleksu porowego zidentyfikowano kilkadziesiąt polipeptydów określanych mianem **nukleoporyn**. Białka te odgrywają istotną rolę w przekaźnictwie jądrowo-cytoplazmatycznym. Kanał centralny jądrowego kompleksu porowego często, chociaż nie zawsze, zawiera strukturę określaną mianem **kompleksu kanału centralnego** lub transportera, czopu, a wcześniej ziarnistości centralnej. Zmienność ultrastruktury tego kompleksu sugeruje, iż reprezentuje on transportowaną molekułę (kargo) przechodzącą przez jądrowy kompleks porowy.

Blaszka jądrowa

Blaszka jądrowa jest stałą strukturą o grubości 10–100 nm przylegającą do nukleoplazmatycznej



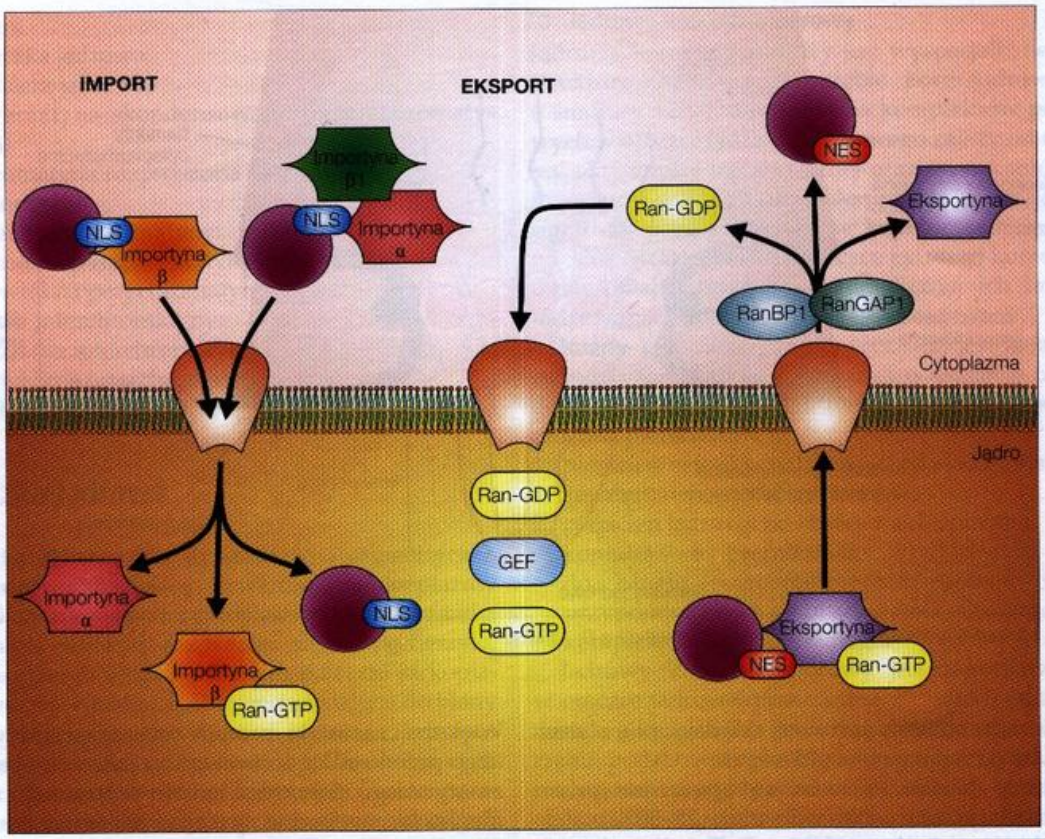
Rycina 1.2 Jądrowy kompleks porowy. (zmodyfikowane wg B. Alberts).

powierzchni otoczki jądrowej, składającą się z sieci delikatnych włókienek białkowych.

Fibryle blaszki jądrowej są utworzone przez białka klasy lamin, stanowiące ok. 25–50% białek otoczki. U ssaków wyróżnia się 3 rodzaje lamin: A, B, C. Ze względu na duże podobieństwo składu aminokwasowego oraz struktury lamin do filamentów pośrednich, są one zaliczane do białek szkieletu jądra (ang. ***nuclear matrix***). Białka blaszki jądrowej stanowią zrąb dla otoczki jądrowej i porowego kompleksu jądrowego, nadając odpowiedni kształt jądru komórkowemu. Laminy są zaangażowane w proces fragmentacji i odbudowy otoczki w czasie podziału mitotycznego. Blaszka jądrowa uczestniczy ponadto w organizacji strukturalnej chromatyny, będąc miejscem umocowania pętli chromatynowych. Laminy, łącząc się z wewnętrzną błoną otoczki jądrowej, określają także kształt jądra.

Wymiana jądrowo-cytoplazmatyczna

Otoczka jądrowa pełni istotną rolę w selektywnej, dwukierunkowej wymianie jądrowo-cytoplazmatycznej. Kanały peryferyczne jądrowych kompleksów porowych w wyniku nieselektywnej dyfuzji biernej umożliwiają przemieszczanie jonów, metabolitów, protein poniżej 40 kDa. Transport przez kanał centralny kompleksu poru ma charakter aktywny i służy przechodzeniu cząstek większych o charakterze RNP, a także polimeraz i lamin. Większe cząsteczki protein wymagają specyficznego przenośnika do transportu jądrowo-cytoplazmatycznego. Struktura kanału centralnego uniemożliwia swobodne przechodzenie cząsteczek niejądrowych. Proteiny przemieszczające się przez pory jądrowe posiadają krótkie sekwencje sygnałowe aminokwasów (ang. NLS, *nuclear localization signals*, oraz NES, *nuclear export signals*) przyczepione do przenoszonych białek (ryc. 1.3). Sygnały te są rozpoznawane przez białka transportowe, zwane **importynami i eksportynami**. Umożliwia to przemieszczenie tych białek przez kompleks porowy. NLS może występować w dwóch postaciach. Podstawowe typy NLS są rozpoznawane przez importynę α. Przenosi ona białko zawierające podstawowy typ NLS w połączeniu z importyną β1. Rodzina białek importyny β1 może rozpoznawać niektóre NLS i transportować je przez kompleks porowy samodzielnie. Kompleks przenoszonego białka z importyną w trakcie przemieszczania się do jądra w obrębie kompleksu poru wchodzi w przejściową interakcję z białkami (zawierającymi szereg powtórzeń fenyloalanina-glicyna), zwanymi **nukleoporynami FG.** W obrębie jądra związanie formy Ran-GTP z importyną β1 doprowadza do zmian konformacyjnych, w wyniku których od importyny odłączają się transportowane białka (kargo). Zmiana konformacji białka Ran w zależności od jego wiązania GTP lub GDP wpływa na siłę



Rycina 1.3 Mechanizm wymiany jądrowo-cytoplazmatycznej (zmodyfikowane wg T. Sekimoto, Y. Yoneda). NLS (*nuclear localizatin signal*) – sygnał lokalizacji jądrowej, NES (*nuclear export signal*) – sygnał eksportu jądrowego, Ran (*RAs – related nuclear protein*) – białko regulujące oddziaływanie między receptorami transportu a białkami transportowymi, RanGTP (*GTP – binding protein Ran*) – białko Ran wiążące GTP, Ran GDP (*GDP – binding protein Ran*) – białko Ran wiążące GDP.

interakcji tego białka z transportowanym kompleksem. Importyny powracają do cytoplazmy, by uczestniczyć w kolejnej rundzie transportu. Również wymiana w kierunku przeciwnym, z jądra do cytoplazmy, głównie cząstek RNP (RNA + białko), odbywa się przez jądrowy kompleks porowy. Sekwencja sygnałowa eksportu jądrowego (NES), bogata w leucynę, jest rozpoznawana przez CRM1/eksportynę1. Czynnik CRM1 z rodziny importyn, wiążąc Ran-GTP, tworzy z przenoszonym białkiem trójczłonowy kompleks. Po przejściu przez kompleks porowy uwolnienie przenoszonego białka następuje w wyniku konwersji Ran-GTP do Ran-GDP. Niezależnie od jądrowego importu niektóre proteiny z rodziny importyn β, liczącej ok. 20 białek, uczestniczą w transporcie w obu kierunkach.

Macierz jądrowa

Nazwą macierzy jądrowej (matriks jądrowa, nukleoszkielet, szkielet jądrowy; NM, *nuclear matrix*) jest określana pozachromatynowa struktura pozostała po trawieniu jądra komórkowego buforami o wysokiej sile jonowej, niejonowymi detergentami i nukleazami. Strukturę białkowej macierzy jądrowej tworzą trzy elementy odpowiadające określonym domenom jądra komórkowego:

1. blaszka jądrowa z jądrowymi kompleksami porowymi, będąca pozostałością otoczki jądrowej,
2. jąderka resztkowe,
3. włóknisto-ziarnista sieć pozająderkowa znajdująca się w przestrzeni interchromatynowej, tworząca tzw. macierz wewnętrzną (ang. *internal matrix*).

Funkcja macierzy jądrowej

Zarówno ultrastruktura, jak i skład chemiczny macierzy jądrowej zależą od zastosowanej procedury ekstrakcji jąder komórkowych. W skład macierzy jądrowej wchodzi ok. 98% białek oraz niewielkie ilości kwasów nukleinowych i fosfolipidów. Macierz jądrową tworzą włókienka o średnicy 3–5 nm, składające się z charakterystycznych białek zwanych **matrynami**. Wśród niehistonowych białek macierzy wyizolowano: laminy, białka Ag-NOR, aktynę, białka rybonukleoprotein jądrowych. Poza włóknami, zwanymi także **matrycyną**, strukturę macierzy tworzą także gęste elektronowo ziarna o średnicy 15 nm. Ziarna te są kojarzone ze składnikiem ziarnistym jąderka, co sugeruje udział macierzy jądrowej w wymianie jądrowo-cytoplazmatycznej.

Macierz jądrowa jest dynamiczną strukturą uczestniczącą aktywnie w metabolizmie jądra. Spośród najważniejszych hipotetycznych funkcji macierzy należy wymienić:

1. udział macierzy jądrowej w organizacji strukturalnej jądra oraz w tworzeniu konfiguracji przestrzennej chromatyny,
2. odgrywanie roli w procesie replikacji DNA; z filamentami macierzy są związane wieloenzymatyczne kompleksy replikacyjne,
3. uczestnictwo w regulacji ekspresji genów,
4. udział w transkrypcji i dojrzewaniu pre-rRNA oraz hnRNA, a także transporcie prekursorów rybosomów do cytoplazmy,
5. wiązanie hormonów steroidowych przez struktury macierzy jądrowej,
6. zaangażowanie w proces wirogenezy; fosforylacja białek wirusowych,
7. wiązanie karcynogenów.

Wyżej wymienione funkcje świadczą o kluczowym znaczeniu tej struktury w aktywności metabolicznej jądra komórkowego.

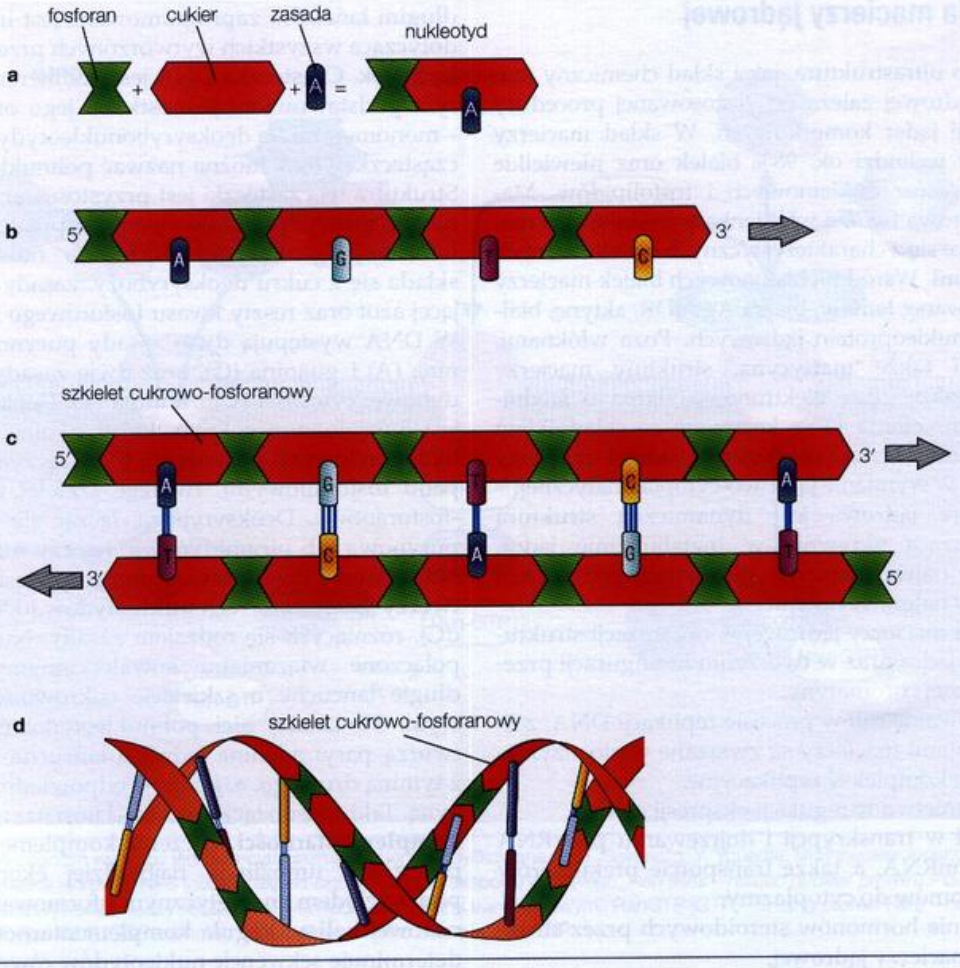
Budowa i struktura kwasów nukleinowych

Składniki DNA

U człowieka, podobnie jak u innych organizmów, DNA jest nośnikiem informacji genetycznej. Zawartość DNA wykazuje różnice gatunkowe i skorelowana jest z łączną długością chromosomów, a nie ich liczbą. Każdy chromosom buduje jedna cząsteczka DNA, co sprawia, że liczba cząsteczek DNA równa jest liczbie chromosomów. W jego długim łańcuchu zaprogramowana jest informacja dotycząca wszystkich wytworzonych przez komórkę białek. Cząsteczka DNA jest polimerem, w którym podstawowymi jednostkami jego organizacji – monomerami, są deoksyrybonukleotydy. Dlatego cząsteczkę DNA można nazwać polinukleotydem. Struktura tej cząsteczki jest przystosowana do pełnienia funkcji przechowywania i przekazywania informacji genetycznej. Każdy z nukleotydów składa się z cukru deoksyrybozy, zasady zawierającej azot oraz reszty kwasu fosforowego (ryc. 1.4). W DNA występują dwie zasady purynowe: adenina (A) i guanina (G), oraz dwie zasady pirymidynowe: cytozyna (C) i tymina (T). Deoksyryboza jest 5-węglowym cukrem, który swoimi grupami hydroksylowymi przy węglu 5′ i 3′ łączy się z grupami fosforanowymi, tworząc szkielet cukrowo-fosforanowy. Deoksyryboza, łącząc się z zasadą purynową lub pirymidynową, tworzy **nukleozyd**. Nukleozyd wraz z przyłączoną grupą fosforanową tworzy jeden z czterech **nukleotydów** (dA, dT, dG, dC), różniących się rodzajem zasady. Nukleotydy połączone wiązaniami kowalencyjnymi tworzą długie łańcuchy o szkielecie cukrowo-fosforanowym. W każdej nici polinukleotydowej zasady tworzą pary: adenina jednego łańcucha łączy się z tyminą drugiego, a guanina odpowiednio z cytozyną. Taki sposób łączenia zasad nosi nazwę **reguły komplementarności**. Łączenie komplementarnych par zasad umożliwia najbardziej ekonomiczne pod względem energetycznym uformowanie dwuniciowej **helisy**. Reguła komplementarności zasad determinuje sekwencję nukleotydów równoległego łańcucha polinukleotydowego.

Formy przestrzenne DNA

Zgodnie z modelem zaproponowanym przez Watsona i Cricka (1953 r.), cząsteczka DNA jest złożona z dwóch łańcuchów polinukleotydowych połączonych ze sobą wiązaniami wodorowymi istniejącymi między parami komplementarnych zasad. Obydwa łańcuchy DNA, biegnąc w przeciwnych kierunkach, wykazują odwrotną polarność, określaną końcami 3′ i 5′. Jeżeli jeden łańcuch ma polarność 3′→5′, to drugi komplementarny do niego 5′→3′. Obydwa łańcuchy polinukleotydowe są skręcone w dwuniciową helisę DNA, w której sparowane ze sobą zasady są umieszczone wewnątrz helisy. Szkielet cukrowo-fosforanowy znajduje się natomiast na zewnątrz cząsteczki. Reguła komplementarności zasad wymusza proporcje nukleotydów purynowych i pirymidynowych. Wynika z niej, że stosunek A do T i G do C wynosi 1:1 (**reguła Chargaffa**).



Rycina 1.4 Struktura DNA: **a** – podstawowe składniki jednostki DNA, **b** – nić DNA, **c** – dwuniciowy DNA, **d** – dwuniciowa helisa DNA (zmodyfikowane wg B. Alberts).

Stosunek sumy adeniny i tyminy do sumy guaniny i cytozyny (A+T/G+C) jest wartością stałą i charakterystyczną dla określonego gatunku. U człowieka stosunek ten wynosi 1,4 : 1. Średnica helisy wynosi 2 nm. W dwóch łańcuchach, skręconych zgodnie z ruchem wskazówek zegara, na jeden skręt helisy przypada 10 nukleotydów. Ponieważ odległość między nukleotydami wynosi 0,34 nm (odpowiednio do odległości aminokwasów w łańcuchu polipeptydowym), można wyliczyć skok spirali DNA, który wynosi 3,4 nm. Długość łańcucha polinukleotydowego w czasie ewolucji stopniowo się zwiększała, począwszy od wirusów, przez bakterie do wyższych roślin i zwierząt. U człowieka DNA zawiera $5{,}6 \times 10^9$ polinukleotydów, co odpowiada długości łańcucha DNA równej 1,74 m. Uwzględniając konfigurację przestrzenną cząsteczki DNA, można wyróżnić cztery poziomy jej organizacji. Kolejność nukleotydów w łańcuchu polinukleotydowym określa jego **strukturę pierwszorzędową**. Dwa łańcuchy połączone na zasadzie komplementarności wiązaniami wodorowymi w podwójnej helisie tworzą jego **strukturę drugorzędową**. **Strukturę trzeciorzędową** cząsteczka DNA przyjmuje dzięki charakterystycznemu ułożeniu przestrzennemu helisy. Do zaburzenia organizacji przestrzennej DNA dochodzi podczas procesu **denaturacji**.

Plastyczność DNA

Model struktury DNA zaproponowany przez Watsona i Cricka, zgodnie z którym cząsteczka DNA tworzy konstrukcję podwójnej helisy, potwierdził zgodność struktury i funkcji na poziomie molekularnym. Cząsteczka DNA może jednak

występować w formie kolistej lub liniowej, a u niektórych wirusów nawet w formie jednoniciowej. Podwójna helisa DNA może ponadto występować w różnych formach przestrzennych określanych jako **DNA A**, **DNA B** i **DNA Z**. W najbardziej rozpowszechnionej formie przestrzennej, jaką jest DNA B, podwójna nić DNA uformowana w prawoskrętną helisę wytwarza dwie bruzdy określane jako **rowek większy** i **rowek mniejszy**. Struktura DNA B jest formą typową dla roztworów fizjologicznych. Jej konfiguracja przestrzenna odpowiada opisanej wyżej helisie. Struktura DNA Z jest helisą lewoskrętną, której szkielet fosforanowo-cukrowy ma charakterystyczny zygzakowaty kształt. Taką konfigurację helisa przyjmuje, gdy nukleotydy purynowe i pirymidynowe występują w łańcuchu DNA naprzemiennie. Helisa DNA Z ma mniejszą średnicę w porównaniu z formą DNA B. Układ szkieletu cukrowo-fosforanowego DNA Z sprawia, że w tej formie helisy można wyróżnić tylko jeden rowek. Konfiguracja DNA A jest rzadko występującą formą alternatywną DNA o największej średnicy helisy i najmniejszym skoku jej uzwojenia.

Skład i struktura RNA

Cząsteczka kwasu rybonukleinowego, podobnie jak DNA, jest polimerem, ale pod wieloma względami różniącym się od niej. Różnice te dotyczą zarówno składu, jak i konfiguracji przestrzennej. Łańcuch kwasu rybonukleinowego tworzą nukleotydy składające się, podobnie jak w DNA, z zasady, cukru należącego do pentoz oraz reszty fosforanowej. Cukrem w RNA jest ryboza zamiast deoksyrybozy, tymina (T) jest natomiast zastąpiona uracylem (U). Kwas rybonukleinowy występuje w formie jednoniciowej, pofałdowanej cząsteczki. Jedynie w pewnych fragmentach pofałdowanej nici jej komplementarne odcinki mogą tworzyć struktury dwuniciowe.

Replikacja DNA

Replikacja DNA jest wieloenzymatycznym, wieloetapowym procesem powielania macierzystych cząsteczek DNA w poprzedzającej podział fazie S cyklu komórkowego. Odwzorowaniu podlega każdy z łańcuchów podwójnej helisy DNA. Proces replikacji jest katalizowany przez kompleks enzymatyczny zwany **aparatem replikacyjnym**. W jego skład wchodzą enzymy rozplatające helisę DNA, białka stabilizujące jednoniciowy DNA, polimerazy DNA. Na każdym z łańcuchów DNA w sposób wysoce skoordynowany, z bardzo dużą szybkością (w komórkach eukariotycznych 50 nukleotydów/s) są montowane komplementarne łańcuchy potomne.

Początek replikacji

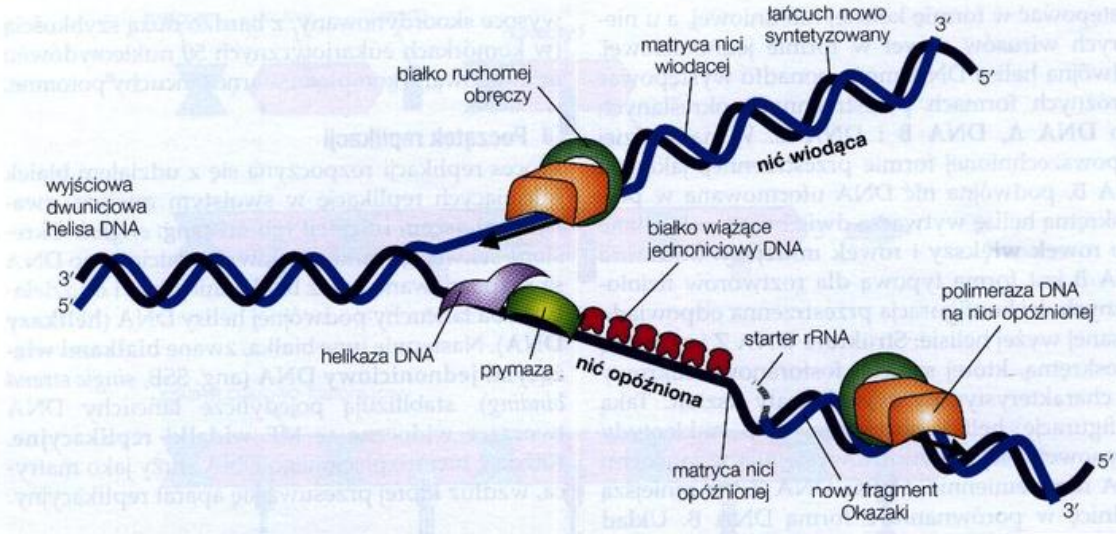
Proces replikacji rozpoczyna się z udziałem białek inicjujących replikację w swoistym miejscu, zwanym **miejscem inicjacji** lub **ori** (ang. *origin*). Określone sekwencje nukleotydów dwuniciowego DNA są rozpoznawane przez białka inicjujące i oddzielające oba łańcuchy podwójnej helisy DNA (**helikazy DNA**). Następnie inne białka, zwane **białkami wiążącymi jednoniciowy DNA** (ang. SSB, *single strand binding*), stabilizują pojedyncze łańcuchy DNA tworzące widoczne w ME **widełki replikacyjne**. Każda z nici rozplecionego DNA służy jako matryca, wzdłuż której przesuwa się aparat replikacyjny.

Widełki replikacyjne

Rozpleciona struktura dwuniciowego DNA przyjmuje charakterystyczny kształt przypominający literę Y, dlatego nosi nazwę widełek replikacyjnych. W każdym miejscu rozpoczynającym replikację powstaje para przeciwstawnie ułożonych widełek replikacyjnych. W obrębie widełek replikacyjnych proces replikacji odbywa się dwukierunkowo. Polimeryzację nukleotydów w nowo powstającym łańcuchu katalizuje **polimeraza DNA**. Przyłączanie nukleotydu do grupy hydroksylowej na końcu 3′ łańcucha polinukleotydowego oraz wytworzenie wiązania fosfodiestrowego na końcu 5′ przyłączonego nukleotydu sprawia, że nowy łańcuch polinukleotydowy powstaje zawsze w kierunku 5′→3′ (ryc. 1.5). Kolejność polimeryzacji wyznacza sekwencja nukleotydów matrycowego DNA. Proces polimeryzacji przebiega dzięki dostarczaniu energii, której źródłem jest hydroliza ATP. Polimeraza DNA jest najważniejszym enzymem aparatu replikacyjnego, ciągle związanym i poruszającym się wzdłuż nici DNA. Dodatkowe białka aparatu replikacyjnego umożliwiają rozpoznanie miejsca startu i w sposób skoordynowany umożliwiają sprawną syntezę łańcuchów potomnych.

Przebieg replikacji

Do rozpoczęcia syntezy potrzebny jest enzym polimeryzujący na matrycy DNA krótki 9–10-nukleotydowy fragment RNA, służący jako **starter** (ang. *primer*). Enzym ten nosi nazwę **prymazy**. Po utworzeniu startera polimeraza DNA zgodnie z regułą komplementarności zasad przyłącza nukleotydy w kierunku 5′→3′ w przeciwbieżnych łańcuchach DNA widełek replikacyjnych.



Rycina 1.5 Współpraca białek aparatu replikacyjnego (zmodyfikowane wg B. Alberts).

Na łańcuchu o kierunku 5′→3′ synteza odbywa się w sposób ciągły, stąd powstały na tym łańcuchu matrycowym łańcuch potomny nosi nazwę **nici wiodącej** (ang. *leading strand*). Drugi łańcuch potomny powstały na matrycowym DNA, zorientowanym przeciwnie, tzn. od 3′→5′, jest syntetyzowany w sposób nieciągły, w postaci krótkich 100–300 pnt (par nukleotydowych) fragmentów DNA (tzw. fragmentów Okazaki – od nazwiska Reji Okazaki, który je odkrył). Łańcuch polinukleotydowy syntetyzowany w sposób nieciągły jest nazywany **nicią opóźnioną** (ang. *lagging strand*). Odmienny sposób syntezy łańcucha polinukleotydowego nici wiodącej i opóźnionej decyduje o asymetrii widełek replikacyjnych. Do rozpoczęcia syntezy w miejscu ori nici wiodącej potrzebny jest ponadto jeden starter. Polimeryzacja na nici opóźnionej, gdzie replikacja odbywa się nieciągle, wymaga natomiast wielu fragmentów starterowych RNA. Fragmenty Okazaki powstałe na nici opóźnionej są łączone kowalencyjnie w jeden łańcuch. Odbywa się to z udziałem dodatkowych białek enzymatycznych aparatu replikacyjnego. Najpierw usuwają one starterowy RNA, wymieniając go za pomocą **nukleazy** na fragmenty DNA. Inny enzym, zwany **polimerazą naprawczą DNA**, łączy poszczególne deoksyrybonukleotydy. W następnym etapie za pośrednictwem **ligazy DNA** odbywa się połączenie poszczególnych fragmentów DNA (fosforan końca 5′ jednego fragmentu łączy się z końcem 3′ hydroksylowym następnego fragmentu polinukleotydowego). Wydłużanie łańcucha potomnego DNA odbywa się w ścisłym powiązaniu z przesuwaniem aparatu replikacyjnego wzdłuż nici DNA.

Kluczowe znaczenie polimerazy DNA w tym działającym w sposób skoordynowany aparacie, wynika nie tylko z możliwości katalizowania reakcji polimeryzacji, ale także z możliwości korygowania błędnego parowania nukleotydów. Proces korygowania błędów replikacji nosi nazwę **redagowania**. Proces replikacji jest bardzo precyzyjny, chociaż szybkość wzrostu łańcucha w komórkach eukariotycznych jest bardzo duża i wynosi 50–100 nukleotydów/s. Błędne sparowanie nukleotydów zdarza się nie częściej niż 1 raz na 10^7 nukleotydów sparowanych bezbłędnie. W czasie redagowania polimeraza przyłącza nowy nukleotyd tylko w przypadku poprawnego sparowania poprzedzającego nukleotydu. Takie działanie polimerazy podczas redagowania jest możliwe dzięki jej aktywności nukleazowej w kierunku przeciwnym do kierunku replikacji (3′→5′). Aktywność nukleazowa polimerazy ujawnia się tylko w przypadku źle sparowanych poprzedzających nukleotydów. Nienaprawione w procesie redagowania błędy replikacji powodują mutacje, zmieniające strukturę DNA. Mutacje są powielane w kolejnych cyklach replikacyjnych.

Współpraca białek aparatu replikacyjnego

W wieloenzymatycznym kompleksie replikacyjnym, oprócz wyżej wspomnianych białek pomocniczych, jak helikazy i białka wiążące jednoniciowy DNA, istotną rolę pełni białko nazywane **ruchomą**

obręczą. Białko to umożliwia ślizgowe ruchy polimerazy wzdłuż łańcucha DNA. Białko ruchomej obręczy zabezpiecza ścisłe połączenie polimerazy z matrycą DNA, tworząc pierścień, który łącząc się z polimerazą, ułatwia jej ruch postępowy wzdłuż matrycowego DNA. Na nici opóźnionej białko ruchomej obręczy po syntezie każdego fragmentu polinukleotydowego jest uwalniane od DNA. Współpracę białek aparatu replikacyjnego przedstawiono na rycinie 1.5. Hipotetyczna struktura wieloenzymatycznego aparatu replikacyjnego jest zwartą jednostką przesuwającą się wzdłuż DNA. Umożliwia jednoczesną syntezę obu łańcuchów potomnych na matrycy macierzystego DNA. Taki rodzaj replikacji nosi nazwę **replikacji semikonserwatywnej**.

Naprawa DNA

Znaczenie naprawy DNA

U organizmów wyższych w wyniku ewolucji zostało wytworzonych wiele systemów naprawy DNA zapewniających dużą stabilność sekwencji DNA oraz integralność genomu. O niezwykle precyzyjnym i wiernym systemie replikacji już wspomniano wyżej. Wierność i powtarzalność replikacji jest możliwa dzięki mechanizmowi korektorskiemu, związanemu z aktywnością polimerazy DNA. Mechanizm ten zapewnia wierność replikacji na poziomie 1 błędu na 10^7 par zasad. Enzymatyczne mechanizmy naprawy korygują uszkodzenia DNA powstające spontanicznie w czasie przemian metabolicznych pod wpływem czynników zarówno endogennych, jak i egzogennych. Mechanizmy te działają podczas replikacji DNA i w okresach międzypodziałowych. Błędy replikacji mają najczęściej charakter przejściowy, są bowiem szybko korygowane przez różne systemy naprawy DNA. Jeżeli powstałe defekty nie są jednak rozpoznawane i usuwane przez komórkowe mechanizmy naprawy enzymatycznej, mogą w kolejnych cyklach komórkowych prowadzić do utrwalonych zmian struktury DNA i powstawania **mutacji**. Liczne mutacje mogą być przyczyną śmierci komórki. Większość błędów w sekwencji DNA powstaje w czasie replikacji DNA. Jak wyliczono, w życiu człowieka odbywa się 10^{17} podziałów komórkowych. W każdym z tych podziałów dochodzi do ustalenia kolejności 6×10^9 nukleotydów DNA, co sprawia, że w ciągu całego życia istnieje 6×10^{26} możliwości powstania błędu, będącego początkiem drogi prowadzącej do mutacji. Wprawdzie błędy w działaniu aparatu replikacyjnego występują najczęściej, ale jest to tylko jedna z przyczyn prowadzących do mutacji. Uszkodzenia DNA mogą być wywołane przez wiele czynników fizycznych i chemicznych obecnych w otaczającym nas środowisku. Systemy naprawcze zabezpieczające stabilność DNA chronią organizmy wielokomórkowe przed możliwością powstania zaburzeń w fizjologicznych procesach rozwoju organizmu. Należy jednak podkreślić, że możliwość powstawania i utrwalania się zmian w sekwencji DNA jest warunkiem tworzenia zmienności genetycznej organizmów. Równowagi wyżej wymienionych procesów strzeże złożony aparat enzymatyczny związany z DNA.

Mechanizm naprawy DNA

Pierwsze zabezpieczenie dużej stabilności DNA stanowi aparat replikacyjny komórki, usuwający pomyłki już podczas replikacji. Dzięki jego działaniu błędy w sekwencji DNA, występujące z częstością 1 pomyłki na 10^7 nukleotydów, są w 99% korygowane przez aparat replikacyjny, co sprawia, że po replikacji nie występują częściej niż jeden błąd na 10^9 nukleotydów prawidłowo sparowanych. O znaczeniu naprawy DNA dla zachowania integralności genomu świadczy liczba ponad 70 genów, których produkty białkowe uczestniczą w różnych systemach naprawy DNA. Wśród najbardziej istotnych, chociaż nie do końca poznanych systemów, należy wymienić naprawy:

1. przez bezpośrednią rewersję uszkodzenia,
2. przez wycinanie zasad azotowych,
3. przez wycinanie nukleotydów,
4. błędnie sparowanych zasad azotowych,
5. przez rekombinację.

Naprawa przez bezpośrednią rewersję uszkodzenia

Jest to jednoetapowy proces naprawczy, w czasie którego zostaje zachowana integralność łańcucha DNA. Ten rodzaj naprawy odbywa się z udziałem enzymów naprawczych: **metylotransferazy** oraz **fotoliazy DNA**. Metylotransferaza katalizuje przeniesienie grup alkilowych z zasad azotowych na cysteinę będącą wewnętrznym akceptorem. Najwyższą jej aktywność wykazano w wątrobie człowieka, najniższą w komórkach prekursorowych szpiku. Interesujące jest zmniejszenie ekspresji genu metylotransferazy w komórkach nowotworowych, ponieważ wiele nowotworów wykazuje dużą oporność na chemioterapię czynnikami alkilującymi. Fotoliazy DNA usuwają dimery pirymidynowe oraz rozszczepiają fotoprodukty pirymidynowe

z utworzeniem zasad, które wchodziły w skład tych fotoproduktów.

Naprawa przez wycinanie zasad azotowych

W pierwszym etapie naprawy przez wycinanie zasad azotowych następuje hydroliza wiązania glikozydowego między zmodyfikowaną zasadą a pierścieniem cukrowym. Dokonują tego **glikozylazy DNA**. Jest to grupa dobrze rozpoznanych kilkunastu enzymów, różniących się swoistością substratową. W wyniku ich działania w łańcuchu DNA powstaje wolne miejsce, określane **miejscem AP** (ang. *acceptor place*). W następnym etapie miejsca te są rozpoznawane przez endonukleazy określane jako **endonukleazy AP**, które hydrolizując wiązanie 5′-fosfodiestrowe między nukleotydem po stronie 5′ uszkodzenia a deoksyrybozą już pozbawioną zasady azotowej, przecinają łańcuch DNA. W kolejnym etapie są usuwane resztki uszkodzonego nukleotydu. Powstaje w ten sposób ubytek w naprawianym łańcuchu, który wypełniają **polimerazy DNA**. W ostatnim etapie enzymy z grupy **ligaz** łączą fragmenty nici DNA w jeden łańcuch.

Naprawa przez wycinanie nukleotydów

W początkowym etapie mechanizmu naprawy przez wycinanie, po rozpoznaniu uszkodzenia, zależna od ATP endonukleaza nacina nić DNA po obu stronach uszkodzenia. Odbywa się to z udziałem całego kompleksu białek pomocniczych. **Helikazy** razem z ATP przeprowadzają miejscowe rozwinięcie helisy DNA, ułatwiając przecięcie nici po obu stronach uszkodzenia. Uczestniczące w tym procesie endonukleazy trawią bowiem DNA w miejscach zetknięcia się pojedynczej nici z podwójną helisą; najpierw po stronie 3′, a następnie po stronie 5′ uszkodzenia. Wówczas 30-nukleotydowa sekwencja jednoniciowego DNA wraz z częścią białek pomocniczych zostaje rozłączona z DNA. W następnym etapie odbywa się synteza naprawcza nowej nici DNA na matrycy nici komplementarnej. Syntezę tę przeprowadza kompleks replikacyjny składający się z polimeraz DNA połączonych z PCNA i tzw. **czynnikiem replikacyjnym C** (ang. RFC, *replication factor* C) jako kofaktorami reakcji. Obydwa kofaktory biorą udział w inicjacji syntezy DNA. Po wypełnieniu powstałej przerwy przez komplementarny fragment naprawianej nici DNA jej końce są łączone przez **ligazę DNA**. Przedstawiony mechanizm naprawy przez wycinanie jest szlakiem podstawowym, usuwającym większość uszkodzeń DNA. Szybkość usuwania tych uszkodzeń zależy od stopnia zaburzenia drugorzędowej struktury DNA. Większe zniekształcenia podwójnej helisy DNA, wywołane przez promieniowanie ultrafioletowe, są usuwane znacznie szybciej niż niewielkiego stopnia zmiany struktury drugorzędowej.

KLINIKA

Z niewydolnością systemu naprawy przez wycinanie jest związana zwiększona zachorowalność na nowotwory, a także zaburzenia wzrostu, opóźnienie rozwoju umysłowego, postępujące zwyrodnienie układu nerwowego, zmiany skórne. U chorych na *Xeroderma pigmentosum* rak skóry występuje 1000-krotnie częściej niż w pozostałej populacji. W schorzeniu tym stwierdza się defekt genu kodującego jedną z helikaz uczestniczących w procesie naprawy DNA. W komórkach eksponowanych na światło słoneczne następuje nagromadzenie dimerów pirymidynowych, komórka nie dysponuje bowiem mechanizmami do ich usuwania. Zmiany skórne występują tylko u osób narażonych na promieniowanie słoneczne.

Alternatywną drogą naprawy przez wycinanie nukleotydów jest szlak sprzężony z transkrypcją. Szlak ten uczestniczy w naprawie uszkodzeń, blokujących syntezę mRNA, przeprowadzaną przez polimerazę II RNA. Mechanizm naprawy w tym systemie nie jest do końca wyjaśniony, chociaż wiadomo, iż w komórkach ludzkich uczestniczą w nim białka określane jako CSA i CSB. Białka te zmieniają konfigurację przestrzenną chromatyny w taki sposób, że białka naprawcze mają ułatwiony dostęp do nici DNA.

KLINIKA

Z defektem genów kodujących wymienione wyżej białka związany jest zespół Cockayne'a (CS), w którym występują zaburzenia transkrypcji i brak preferencyjnej naprawy transkrybowanego DNA. Chorzy z defektem białek naprawczych w zespole Cockayne'a charakteryzują się: karłowatym wzrostem, niedorozwojem umysłowym, postępującym zwyrodnieniem układu nerwowego, uszkodzeniem narządu wzroku i słuchu, małogłowiem, obniżeniem odporności, przyspieszeniem procesu starzenia.

Naprawa błędnie sparowanych zasad azotowych

Jest to system naprawczy uczestniczący w usuwaniu błędów aparatu replikacyjnego, które nie zostały skorygowane przez polimerazy DNA pod-

czas replikacji. Usuwa także błędne sparowania powstałe w wyniku rekombinacji, jak również błędy będące skutkiem działania związków chemicznych. Znaczenie tego systemu naprawy jest tak duże, ponieważ błędy sparowania mogą być źródłem mutacji punktowych, jeżeli nie zostaną rozpoznane i usunięte. Dowiedziono, że mutacje genów kodujących niektóre białka tego systemu naprawczego są związane z występowaniem raka jelita grubego. Jeżeli u osoby, która odziedziczyła jeden uszkodzony gen, nastąpi mutacja drugiej kopii genu (np. w wyniku błędnego działania systemu naprawy źle sparowanych zasad), powstaje duże ryzyko transformacji nowotworowej. Źle sparowane zasady zaburzają geometrię helisy DNA i są rozpoznawane przez białka naprawiające. W następstwie tego przecinany jest fragment nowo zsyntetyzowanej nici. Następnie utworzoną lukę wypełniają polimerazy DNA i ligaza DNA, dokonując połączenia końców nici. Przerwa w ciągłości nowo powstałej nici jest sygnałem dla białek uczestniczących w naprawie.

KLINIKA

Przykładem mutacji punktowej jest niedokrwistość sierpowatokrwinkowa (drepanocytoza). Zamiana jednego nukleotydu w genie hemoglobiny (adeniny na uracyl) sprawia, iż w łańcuchu aminokwasowym hemoglobiny kwas glutaminowy zostaje zastąpiony waliną. Zmienia to własności fizykochemiczne cząsteczki hemoglobiny zwanej HbS, która łatwiej podlega krystalizacji. Powstają agregaty krwinkowe, które utrudniają przepływ krwi przez narządy.

Niedotlenienie tkanek charakteryzuje się bladością powłok (zawały), owrzodzeniami podudzi, zmianami kostnymi i neurologicznymi, uszkodzeniem serca i nerek, skłonnością do zakażeń.

Naprawa przez rekombinację

System naprawy przez rekombinację uczestniczy w naprawie pęknięć dwuniciowych. Następstwem zaburzeń tego systemu naprawy mogą być aberracje chromosomowe.

Naprawa przez rekombinację w komórkach eukariotycznych jest związana z fazą cyklu komórkowego. W komórkach ssaków istnieją 3 szlaki naprawy pęknięć dwuniciowych: rekombinacja homologiczna, dopasowywanie pojedynczych nici DNA, rekombinacja niehomologiczna. W fazach G1 i wczesnej fazie S dominuje rekombinacja niehomologiczna, a w późnej fazie S i G2 przeważa rekombinacja homologiczna.

Rekombinacja homologiczna

Rekombinacja homologiczna jest systemem naprawy pęknięć dwuniciowych, wykorzystującym do odtworzenia struktury chromosomu jego nieuszkodzony homolog. Po pęknięciu obu nici DNA, jedna z nich jest trawiona przez **egzonukleazy,** aż do wytworzenia odcinka jednoniciowego z wolnym 3′ końcem. W następnym etapie jest on łączony z prawidłowym chromosomem homologicznym, który służy jako matryca dla odtwarzanej nici.

Dopasowywanie pojedynczych nici DNA

W tym systemie naprawczym białka naprawcze wykorzystują sekwencje powtórzone w sąsiedztwie pęknięcia do dopasowania i połączenia dwóch fragmentów DNA. Nici odcinków niehomologicznych między pęknięciami są przemieszczane poza helisę, a następnie wycinane bezpowrotnie. Decyduje to o stosunkowo dużej wierności tego szlaku naprawy.

Rekombinacja niehomologiczna

Naprawa pęknięcia helisy w tym szlaku odbywa się z udziałem **kinazy białkowej zależnej od DNA** (DNA-PK). Enzym ten przyłącza się do końca dwuniciowego DNA. Jedna z dwóch podjednostek kinazy, o właściwościach **zależnej od ATP helikazy**, zapewnia orientację przestrzenną nici podczas procesu ligacji. Druga podjednostka przeprowadza fosforylację białek uczestniczących w naprawie pęknięcia helisy DNA.

Różnorodność systemów naprawczych oraz białek enzymatycznych w nich uczestniczących decyduje o skuteczności tych mechanizmów naprawy DNA. Trzeba bowiem pamiętać, że każde nienaprawione uszkodzenie DNA może prowadzić do utrwalonych zmian mutacyjnych i mieć zgubne następstwa dla komórki.

Organizacja strukturalna chromatyny

Chromatyna

Podwójna helisa DNA w komórce eukariotycznej ma zmienną długość, która jest cechą gatunkową. Cząsteczka DNA występuje w połączeniu z histonami i białkami niehistonowymi, tworząc włókno deoksyrybonukleinowe (DNP). Kompleks DNA z białkami tworzy złożoną strukturę chromosomów metafazowych, a także występuje w chromatynie jądra interfazalnego (grec. *chroma* – kolorowy). Połączenie DNA z białkami decyduje o własnościach konformacyjnych chromatyny i stopniu upakowa-

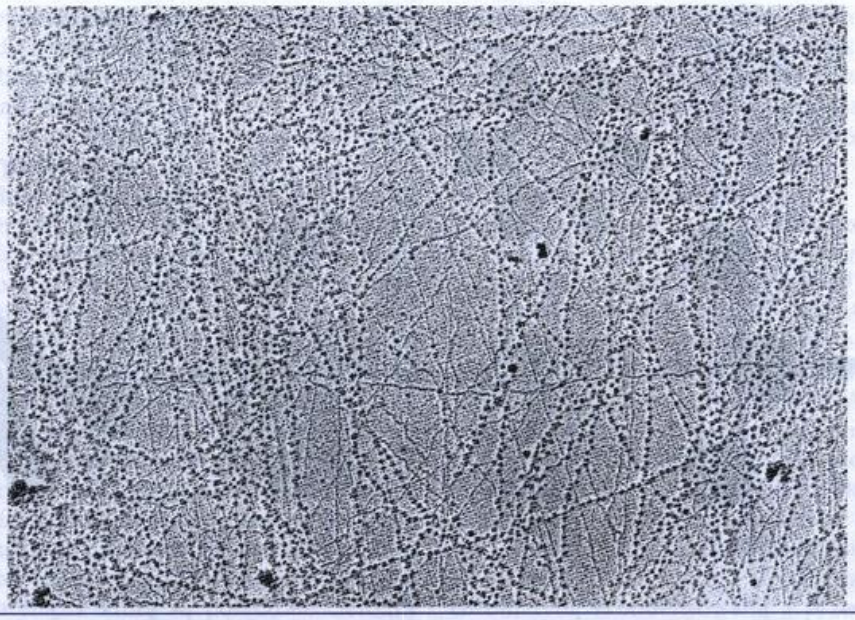
nia DNA w chromosomach. W każdym chromosomie (u człowieka jest ich 46), utworzonym z jednej długiej liniowej cząsteczki DNA, białka stanowiące połowę masy chromatyny decydują o jej upakowaniu w struktury o różnym stopniu kondensacji. Poziom kondensacji chromatyny zmienia się w kolejnych fazach cyklu komórkowego, od najbardziej skondensowanych chromosomów metafazowych do chromatyny rozproszonej reprezentującej zupełnie rozwinięte włókna DNP w interfazie. Oprócz białek uczestniczących w kondensacji DNA, inne rodzaje białek związanych z chromatyną są zaangażowane w procesy ekspresji genów, replikacji i naprawy DNA. Zmiany konformacyjne chromatyny są ściśle związane z jej aktywnością matrycową, bowiem w chromatynie zupełnie rozplecionej najłatwiejszy jest dostęp do DNA enzymów i innych białek, niezbędnych do ekspresji genów i replikacji DNA. W czasie przygotowania do mitozy następuje stopniowa kondensacja włókna nukleohistonowego, osiągająca najwyższy stopień organizacji w chromosomie mitotycznym.

Skład chromatyny

W chromatynie, będącej kompleksem DNA, histonów i białek niehistonowych, większość białek stanowią histony, chociaż w grupie białek niehistonowych wyizolowano ponad 300 białek zarówno kwaśnych, jak i zasadowych o różnej masie cząsteczkowej. Histony są białkami zasadowymi o stosunkowo niskiej masie cząsteczkowej wynoszącej 10–23 kDa. Histony zawierają dużo dodatnio naładowanych aminokwasów – lizyny i argininy (stanowią 20–30% ich sekwencji), oraz nieznaczne ilości cystyny i cysteiny. Dodatnie ładunki histonów umożliwiają ich silne, niekowalencyjne wiązanie z ujemnie naładowanymi resztami kwasu fosforowego szkieletu cukrowo-fosforanowego DNA. Różna zawartość lizyny i argininy w histonach, a także proporcje zawartości aminokwasów kwaśnych do zasadowych, pozwoliły wyróżnić 5 klas histonów: H2A, H2B, H3, H4, H1. Cztery pierwsze są określane mianem histonów rdzeniowych i występują w chromatynie w podobnych ilościach. Histony nie wykazują swoistości gatunkowej w odniesieniu do sekwencji aminokwasów. Określony organizm zwierzęcy ma zazwyczaj kilka różniących się histonów określonej klasy, ulegających ekspresji w różnych tkankach. Cechuje je także brak swoistości tkankowej. Ten wyraźny konserwatyzm sekwencji aminokwasowej histonów dowodzi ich zasadniczej roli w organizacji strukturalnej chromatyny. Histon H1 różni się od innych klas histonów nie tylko największą m. cz. wynoszącą 23 kDa, ale również dużą różnorodnością sekwencji zarówno u różnych gatunków, jak i w obrębie tego samego gatunku. Ponadto histon H1 najłatwiej można wyizolować z chromatyny, co świadczy o innej jego funkcji w porównaniu z histonami rdzeniowymi. Białka niehistonowe, których ilość jest zmienna i odnoszona do aktywności metabolicznej, cechuje duże zróżnicowanie własności fizykochemicznych. Grupa białek niehistonowych obejmuje także polipeptydy specyficzne dla tkanki, gatunku czy stanu czynnościowego jądra. W tej grupie wyróżnić można białka enzymatyczne – związane z syntezą i metabolizmem kwasów nukleinowych oraz modyfikujące białka jądrowe, białka regulatorowe – zaangażowane w proces transkrypcji, oraz białka strukturalne – wchodzące w interakcję z DNA i histonami, niewykazujące specyficzności tkankowej i gatunkowej.

Włókno nukleosomowe (nukleofilament)

Doświadczenia biochemiczne i badania ultrastrukturalne pozwoliły wyizolować i uwidocznić strukturę chromatyny. Trawienie preparatów swoistymi nukleazami mikrokokowymi hydrolizującymi wiązania fosfodiestrowe w kwasie nukleinowym doprowadziło do wyizolowania krótkich fragmentów (ok. 200 polinukleotydów) DNA związanych z białkami oraz łączących je odcinków DNA pozbawionych białka. Metodą łagodnej izolacji chromatyny w ME można uwidocznić podstawową strukturę chromatyny przypominającą sznur korali (ryc. 1.6). Te koraliki połączone z DNA, który jest nawinięty na nie prawie dwukrotnie, są kompleksami DNA i histonów, i noszą nazwę **nukleosomów**. Krótkie trawienie swoistymi nukleazami oddziela fragment helisy między poszczególnymi nukleosomami, tzw. **DNA łącznikowy**. Nukleosom zawiera dwuniciowy DNA o długości ok. 200 par zasad, który w postaci lewoskrętnej helisy tworzy 2 zwoje wokół oktameru histonów (H2A, H2B, H3, H4), określanych dlatego histonami rdzeniowymi. Przy dalszym trawieniu nukleazą uzyskuje się krótszy, ale silniej połączony z histonowym oktamerem fragment helisy o długości ok. 146 par zasad. Tworzy on razem z histonami **rdzeń nukleosomu**. Rdzeń nukleosomu ma wysoce konserwatywny charakter w przeciwieństwie do tkankowo swoistego, łącznikowego DNA o różnej długości w chromatynie różnych tkanek, a nawet tej samej tkanki. Szczegółowa analiza rentgenograficzna wykazała, że nukleosom przyjmuje kształt spłaszczonego klinowato dysku o wysokości 5,7 nm i średnicy 11 nm. Na strukturę tę składają się tetramer



Rycina 1.6 Włókna nukleosomowe w preparacie chromatyny rozproszonej metodą Millera (materiał własny autora).

złożony z histonów H3 i H4 oraz 2 dimery histonów H2A i H2B tworzące oktamer histonowy (ryc. 1.7 b). Na histony nawinięty jest lewoskrętnie, superhelikalnie DNA w formie B, tworząc 1,75 zwoju o średnicy 11 nm, licząc ok. 80 pnt (par polinukleotydów) na jeden zwój. Zwinięcie DNA na rdzeniu histonowym we włóknie 10 nm powoduje 7-krotne skrócenie DNA w nukleofilamencie. Podstawową funkcją nukleosomu jest udział w organizacji strukturalnej chromatyny. Poza upakowywaniem DNA w jądrze, nukleosomy uczestniczą w regulacji tak istotnych procesów, jak transkrypcja i replikacja. W wyniku replikacji i transkrypcji zmienia się struktura przestrzenna nukleosomów. Proces ten jest związany z modyfikacją histonów, oddziaływaniem DNA z czynnikami transkrypcyjnymi oraz kompleksami polimeraz DNA i RNA. Włókno nukleosomowe, zwane także włóknem 10 nm, stanowi drugi poziom organizacji chromatyny (pierwszym jest podwójna helisa DNA).

DNA łącznikowy

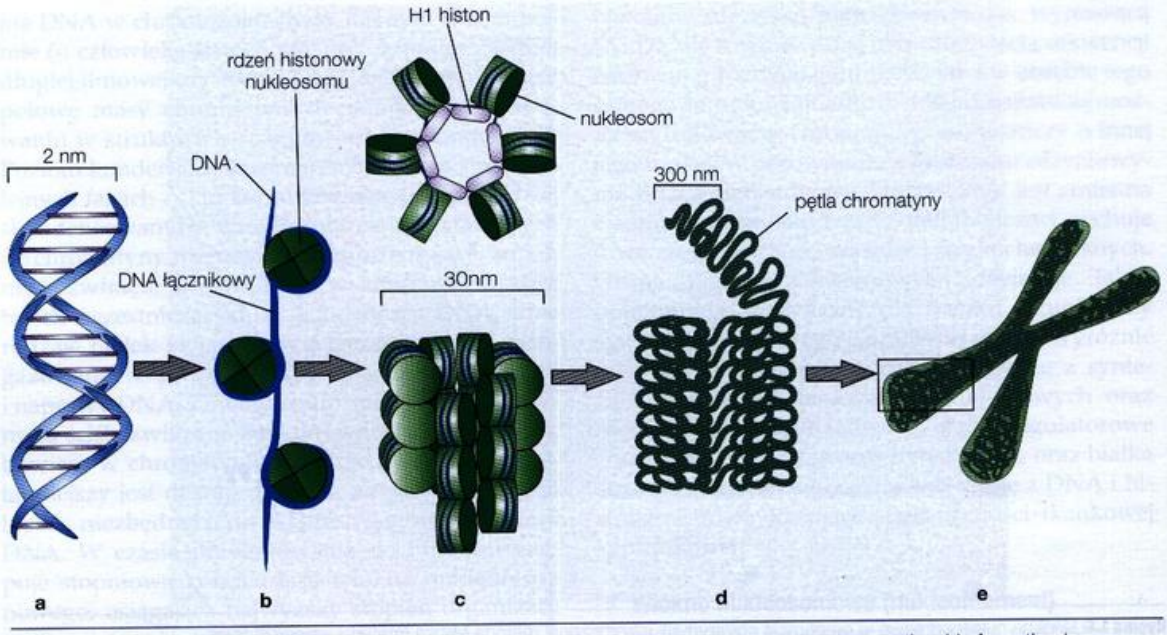
Są to krótkie odcinki podwójnego łańcucha DNA o grubości 1,5 nm i długości 20–95 polinukleotydów, łączące poszczególne nukleosomy i tworzące razem z nimi włókno nukleosomowe („sznur koralików" widoczny w ME) (ryc. 1.6). Długość DNA łącznikowego jest swoista dla różnych organizmów i różnych typów komórek.

Histon H1

Z nukleosomem i DNA związana jest swoista tkankowo cząsteczka histonu H1. Położona jest ona po tej samej stronie nukleosomu, gdzie DNA rozpoczyna nawijanie na rdzeń histonowy i opuszcza nukleosom. Wobec niepełnych dwóch zwojów DNA wokół rdzenia histonowego, nukleosomy wraz z DNA łącznikowym przyjmują charakterystyczne, widoczne na elektronogramach, zygzakowate ułożenie (ryc. 1.7 b). Histon H1, łącząc się z 10 parami nukleotydów DNA „wchodzącego" i „opuszczającego" nukleosom, chroni dodatkowo 20 par nukleotydów oraz cząstkę rdzeniową przed trawieniem nukleazą. Struktura chromatyny zawierająca cząstkę rdzeniową, histon H1 i chronione przez niego 20 pnt nosi nazwę **chromatosomu**.

Solenoid (włókno 30 nm)

Włókno 30 nm reprezentuje wyższy stopień upakowania chromatyny. Znajduje się zarówno w jądrach interfazalnych, jak i w chromosomach. Struktura włókna 30 nm powstaje w wyniku superspiralizacji podstawowego włókna nukleosomowego (nukleofilamentu), doprowadzając do utworzenia regularnej, pustej wewnątrz, helikalnej cewki, zwanej **solenoidem** (ryc. 1.7c). W solenoidzie o średnicy 30 nm włókno nukleosomowe jest zwinięte w lewoskrętną helisę, w której na jeden obrót przypada 6–8 nukleosomów. Skok spirali solenoidu



Rycina 1.7 Budowa strukturalna chromatyny: **a** – podwójna helisa DNA, **b** – włókno nukleosomowe, **c** – solenoid, **d** – pętle, domeny, **e** – chromosom (zmodyfikowane wg: B. Alberts).

wynosi 10 nm, podobnie jak średnica jej wewnętrznego otworu. Kluczową rolę w zwiększaniu stopnia upakowania włókna nukleosomowego w solenoid odgrywa histon H1, który umożliwia odpowiednie zwinięcie chromatyny w regularną strukturę solenoidu. Spłaszczone powierzchnie nukleosomów układają się równolegle do długiej osi solenoidu. Dalsze 7-krotne pozorne skrócenie włókna 30 nm, w porównaniu z włóknem nukleosomowym, powoduje, iż stopień upakowania DNA w strukturze solenoidu wynosi 40. W warunkach doświadczalnych, zamiast cylindrycznych solenoidów włókna 30 nm, można uzyskać globularne struktury określane jako superkoraliki (ang. *superbeads*), składające się z 12 ciasno upakowanych nukleosomów.

Pętle włókien chromatynowych (domeny)

Włókna chromatynowe o średnicy 30 nm, podlegając dalszej kondensacji, mogą tworzyć struktury chromatyny wyższego rzędu określane mianem pętli – **domen**. Pętle są zakotwiczone w białkowym rusztowaniu macierzy jądrowej (białka NHP) lub w blaszce jądrowej. Pętle zawierają 60–100 tys. polinukleotydów, a ich długość wynosi ok. 0,5 μm. Obecność pętli w chromatynie interfazowej zwiększa jej współczynnik upakowania do ok. 1700. Najbardziej skondensowaną formę chromatyny reprezentuje chromosom metafazowy, w którym przy zachowanej strukturze włókna 30 nm współczynnik upakowania DNA wynosi ok. 10 000 razy.

Strefa interchromatyny

W jądrze komórkowym można wyróżnić wiele strukturalno-czynnościowych domen. Ograniczona otoczką jądrową **nukleoplazma** tworzy wyraźnie oddzielony strukturalnie od cytoplazmy przedział związany z metabolizmem i replikacją DNA, syntezą i formowaniem RNA oraz syntezą białek. Uważana początkowo za strukturę amorficzną, dzięki wprowadzeniu mikroskopii elektronowej, nukleoplazma ujawniła różnorodne struktury ziarniste i włókniste, które są morfologicznymi wykładnikami poszczególnych etapów metabolizmu i transportu kwasów nukleinowych. W przestrzeni ograniczonej otoczką jądrową między skupieniami chromatyny skondensowanej, zwanej przestrzenią interchromatynową (IS), można oprócz jąderek wyróżnić:

- ziarna perychromatyny (PG),
- włókna perychromatyny (PF) związane z obrzeżami chromatyny skondensowanej (strefa perychromatyny),
- ziarna interchromatyny (IG),
- włókna interchromatyny (IF).

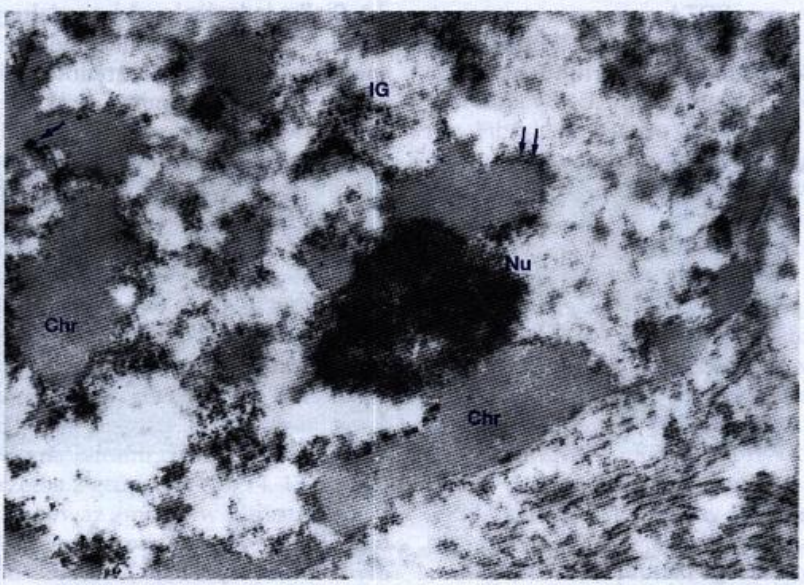
Najbardziej różnorodną morfologicznie, o niewyjaśnionej do końca funkcji, grupą struktur tworzących odrębną domenę strukturalno-czynnościową są ciałka jądrowe (NB).

Ziarna perychromatyny

Ziarna perychromatyny są najwyraźniejszą strukturą strefy perychromatynowej, stanowiącej domenę jądra związaną z transkrypcją i formowaniem mRNA. Są to regularne kuliste ziarna o wysokiej gęstości elektronowej i średnicy 40–50 nm, zlokalizowane w strefie brzeżnej skupień chromatyny skondensowanej (ryc. 1.8). Ziarna perychromatyny są najczęściej spotykane pojedynczo, chociaż w warunkach eksperymentalnych, po zahamowaniu transportu mRNA, dochodzi do ich nagromadzenia w jądrze. Pozwala to przypuszczać, iż struktury te reprezentują formę transportową pozająderkowego mRNA. Po zastosowaniu techniki częściowego rozproszenia chromatyny można uwidocznić związek PG z chromatyną, z którą są połączone cienkim rybonukleoproteinowym włóknem. W pozająderkowych kompleksach transkrypcyjnych, uzyskanych po zupełnym rozproszeniu chromatyny, ziarna te są widoczne na końcach transkryptów. Ziarna perychromatyny po rutynowym kontrastowaniu preparatów mają dookoła wyraźne „halo", pozwalające je odróżnić od otaczającej chromatyny. Składają się z cienkich włókien utworzonych przez rybonukleoproteidy. Związek niektórych niskocząsteczkowych RNA (U6snRNA) z ziarnami perychromatyny sprawia, iż postuluje się udział tych struktur w procesie składania mRNA.

Włókna perychromatyny

Włókna perychromatyny są zlokalizowane w strefie brzeżnej chromatyny skondensowanej w postaci dobrze kontrastujących się na tle przejaśnionej w barwieniu preferencyjnym z EDTA chromatyny. Włókienka są nieregularnie zwinięte i mają średnicę 3–4 nm. Włókna te zawierają heterogenny jądrowy RNA, będący prekursorem mRNA (pre-mRNA). Po stymulacji transkrypcji pozająderkowego RNA tworzy się wyraźna strefa zagęszczenia PF w postaci otoczki między chromatyną skondensowaną a przestrzenią interchromatynową. Zablokowanie transkrypcji hnRNA powoduje znikanie PF w strefie okołochromatynowej. Strefa brzeżna między chromatyną skondensowaną a przestrzenią interchromatynową jest więc poza jąderkiem najbardziej aktywną czynnościowo domeną jądra. Intensywność syntezy pozająderkowego, heterogennego RNA zawartego we włóknach perychromatyny jest ściśle skorelowana z szerokością strefy zagęszczeń, odpowiadającej nagromadzeniu włókien perychromatyny.



Rycina 1.8 Struktura strefy perychromatynowej: gruba strzałka – ziarna perychromatyny, dwie cienkie strzałki – włókna perychromatyny, Chr – chromatyna skondensowana (przejaśniona po zastosowaniu czynnika chelatującego – EDTA), Nu – jąderko, IG – ziarna interchromatyny (materiał własny autora).

UNIWERSYTET ZIELONOGÓRSKI BU

Zastosowanie techniki autoradiografii na poziomie ME oraz rozproszenia chromatyny do uwidocznienia kompleksów transkrypcyjnych pozwoliło ustalić, iż włókna perychromatyny reprezentują cząsteczki RNP przyczepione do matrycy DNA w przebiegu transkrypcji (odpowiadają pozająderkowym kompleksom transkrypcyjnym).

Ultrastruktura pozająderkowych kompleksów transkrypcyjnych

Morfologia pozająderkowych kompleksów transkrypcyjnych, będących obrazem genów hnRNA „w czasie pracy", różni się wyraźnie od aktywnych genów jąderkowych (rDNA). W przeciwieństwie do jąderkowych kompleksów transkrypcyjnych, rozmieszczenie RNP (transkryptów) przyczepionych do osi DNA jest nieregularne (ryc. 1.9). Transkrypty nie mają charakterystycznej wzrastającej długości, jak w aktywnych genach rDNA, co nie pozwala na określenie kierunku transkrypcji. U podstawy transkryptów są widoczne wyraźne cząsteczki Pol II RNA (ryc. 1.9a – strzałka), a obecne niekiedy na końcach transkryptów granule odpowiadają wielkością GP i reprezentują prawdopodobnie zwiniętą formę transportową pre-mRNA.

Włókna interchromatyny

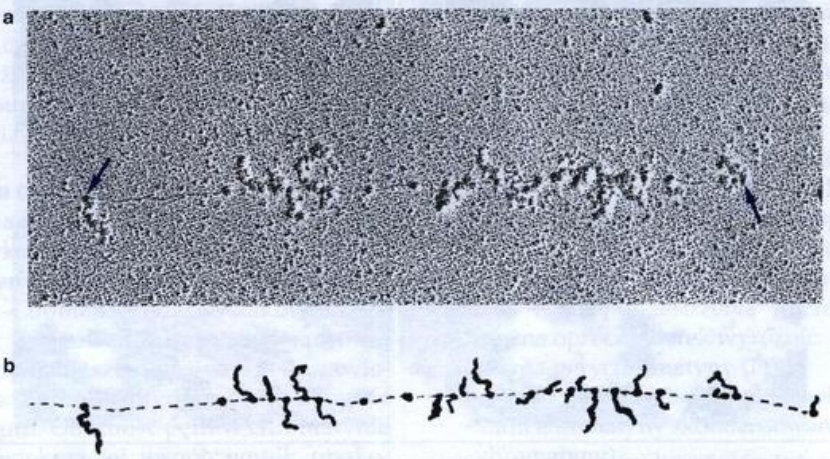
Włókna interchromatyny, wykryte najpóźniej ze wszystkich struktur RNP przestrzeni interchromatynowej, mogą być uwidocznione w kontrastowaniu preferencyjnym z EDTA oraz po zastosowaniu autoradiografii wysokorozdzielczej. Reprezentują morfologiczny wykładnik transportu PF w nukleoplazmie i korespondują z izolowanymi cząsteczkami hnRNP w czasie ich migracji w przestrzeni interchromatynowej.

Ziarna interchromatyny

Ziarna interchromatyny są stałym składnikiem przestrzeni interchromatynowej jądra komórkowego. Występują w postaci większych lub mniejszych skupień o nieregularnym kształcie ziaren o średnicy 20–25 nm. Ziarna są zbudowane z delikatnie poskręcanych włókienek oraz połączone między sobą włóknami, przez co przypominają luźną sieć. Zwraca uwagę tendencja do skupiania się IG w komórkach nowotworowych oraz traktowanych różnymi związkami (m. in. karcynogenami), a także w komórkach zakażonych wirusami. Zmienia się również ich rozmieszczenie w nukleoplazmie podczas kondensacji i dekondensacji chromatyny. Mimo licznych badań doświadczalnych, ich funkcja pozostaje niewyjaśniona. Ziarna interchromatyny zawierają prawdopodobnie RNA o powolnym metabolizmie, a także klasę niskocząsteczkowych RNA (snRNA). Obecność w IG białek, wykrywanych także w składnikach jąderka (rybocharyny), wskazuje na związek metaboliczny tych struktur. Wśród hipotetycznych funkcji ziaren interchromatynowych, obok ich powiązania z metabolizmem RNA, podkreśla się ich związek z macierzą jądrową i znaczenie w tworzeniu architektury przestrzeni interchromatynowej.

Ciałka jądrowe

Ciałka jądrowe są niejednolitą grupą struktur przestrzeni interchromatynowej o różnorodnej ul-



Rycina 1.9 Pozająderkowe kompleksy transkrypcyjne: **a** – ultrastruktura, **b** – pozająderkowy kompleks transkrypcyjny uwidoczniony po zupełnym rozproszeniu chromatyny techniką Millera (materiał własny autora).

trastrukturze i wciąż nieznanej funkcji. Ich wielkość waha się w szerokich granicach od 0,2 do kilku μm w zależności od ich budowy ultrastrukturalnej. Zazwyczaj są zbudowane z delikatnej fibrylarnej otoczki oraz zawartego wewnątrz ziarnistego rdzenia. W powszechnie stosowanej klasyfikacji wyróżnia się 5 typów morfologicznych ciałek jądrowych.

Odrębną grupę ciałek jądrowych stanowią tzw. **ciałka zwinięte** (ang. CB, *coiled bodies*). Wykryto w nich: proteiny antygenu Sm, fibrylarynę, p80 koilinę, topoizomerazę I DNA oraz różne składniki **spliceosomów**, struktur zawierających pakiet małych jądrowych RNA (U1, U2, U4, U5/U6) oraz biorących udział w składaniu mRNA (zob. podrozdz. *Odczytywanie informacji genetycznej*). Prawdopodobnie ciałka jądrowe są wielofunkcyjnymi strukturami związanymi z magazynowaniem, degradacją lub transportem składników związanych zarówno z pre-mRNA, jak i pre-rRNA.

Przestrzeń interchromatynowa jest więc tą domeną jądra komórkowego, w której odbywa się proces przetwarzania, dojrzewania i składania pre-mRNA oraz transport pre-mRNA z miejsc syntezy przez przestrzeń interchromatynową w kierunku kompleksu porów jądrowych. Procesy te mają swoje wykładniki ultrastrukturalne w postaci wyżej opisanych struktur włóknistych i ziarnistych przestrzeni interchromatynowej.

Jąderko – struktura i funkcja

Jąderka są nieobłonionymi strukturami jądra o sferycznym kształcie, zajmującymi zasadniczą część nukleoplazmy, zwłaszcza w komórkach syntetyzujących duże ilości białka. Jąderka są wysoce dynamicznymi strukturami, zmieniającymi się w cyklu komórkowym. Zanikają w profazie mitozy i odtwarzają się w telofazie w miejscu przewężenia wtórnego, stanowiącego swoisty region chromosomu, zwany okolicą jąderkotwórczą lub **NOR** (ang. *nucleolar organizing region*). Liczba obszarów jąderkotwórczych oraz ich rozmieszczenie na chromosomie są cechami charakterystycznymi dla każdego gatunku. U człowieka obszary jąderkotwórcze są związane z pięcioma parami chromosomów akrocentrycznych: trzema z grupy D – 13, 14, 15 oraz 21 i 22 z grupy G. Ponieważ zmiany w ultrastrukturze jąderka mogą być interpretowane w odniesieniu do metabolizmu komórki, jąderko jest jednym z najlepszych modeli badania związku struktury i funkcji na poziomie molekularnym. Jąderko jest miejscem biogenezy rybosomów. Jest to złożony proces, mający swoje odzwierciedlenie w jego organizacji ultrastrukturalnej.

Składniki jąderka

W obrazach ME można wyróżnić 5 podstawowych składników ultrastrukturalnych aktywnego transkrypcyjnie jąderka. Są to:

1. **ośrodki włókniste** (ang. FC – *fibrillar centers*),
2. **gęsty składnik włóknisty** (ang. DFC – *dense fibrillar component*),
3. **składnik ziarnisty** (ang. GC – *granular component*),
4. **chromatyna związana z jąderkiem** (ang. NAC – *nucleolar associated chromatine*),
5. **wakuole jąderkowe** (ang. NV – *nucleoler vacuoles*).

Trzy pierwsze z ww. składników mają podstawowe znaczenie dla funkcji jąderka ze względu na zawartość RNP.

Ośrodki włókniste

Ośrodki włókniste są interfazalnym odpowiednikiem NOR. Nazwa tego składnika podkreśla jego centralne położenie w jąderku oraz jego włókienkową naturę. Ośrodki są utworzone bowiem z delikatnego luźnego materiału włókienkowego o niewielkiej gęstości elektronowej i otoczone są najczęściej strefami gęstego składnika włóknistego. W ośrodkach włóknistych są zlokalizowane geny kodujące rRNA.

Gęsty składnik włóknisty (DFC)

Gęsty składnik włóknisty jest utworzony z włókien o średnicy 4–5 nm i długości dochodzącej do 50 nm. Fibryle te są gęsto upakowane w pasma często otaczające ośrodki włókniste, sugerując związek funkcjonalny między tymi dwoma strukturami jąderkowymi. DFC zawiera 45S pre-rRNA.

Składnik ziarnisty jąderka (GC)

Składnik ziarnisty jąderka tworzą ziarna o średnicy 15–20 nm w postaci pól często wymieszanych z DFC. Większe powiększenia ujawniają włóknistą naturę ziaren jąderkowych, a porównawcze badania biochemiczne i ultrastrukturalne pozwoliły zlokalizować w nich 28S pre-rRNA. Z licznych badań doświadczalnych wynika, iż synteza pre-rRNA odbywa się między chromatyną wewnątrzjąderkową a DFC jąderka. Migracja zsyntetyzowanego *de novo* pre-rRNA ze strefy DFC do GC jąderka wskazuje, iż DFC jest morfologicznym prekursorem granul jąderkowych. Transformacja gęstego składnika włóknistego w składnik ziar-

nisty odzwierciedla zatem proces dojrzewania pre-rRNA.

Typy strukturalno-czynnościowe jąderek

Intensywność transkrypcji pre-rRNA ma swój wyraz nie tylko w proporcjach podstawowych składników ultrastrukturalnych jąderka, ale także w ich rozmieszczeniu. Uwzględniając te dwa kryteria, można wyróżnić następujące typy jąderek:

1. **jąderka uformowane w nukleolonemę** (jąderka gąbczaste) – aktywne transkrypcyjne jąderka, w których struktury RNP tworzą luźną gąbczastą strukturę; spostrzegane w większości komórek syntetyzujących jąderkowy RNA;
2. **jąderka zwarte** – cechują się jednolitym ciasnym ułożeniem włókien i ziaren jąderkowych, najczęściej wymieszanych; są aktywne transkrypcyjnie i najłatwiej je uwidocznić w jądrach młodych, szybko rosnących komórek;
3. **jąderka zwarte z segregacją składników** – ten typ jąderek jest morfologicznym wyrazem zahamowania syntezy rRNA wywołanej różnymi czynnikami chemicznymi lub fizycznymi; poszczególne składniki RNP jąderka tworzą wyraźnie oddzielone od siebie strefy;
4. **jąderka pierścieniowate** – charakteryzują się obwodowym rozmieszczeniem składników RNP; nieliczne struktury RNP są widoczne w części środkowej jąderka; reprezentują zupełne zahamowanie syntezy RNA lub jej bardzo wolny przebieg, ale stan ten może być odwracalny;
5. **mikrojąderka** (jąderka resztkowe) – są morfologicznym odzwierciedleniem zahamowania syntezy RNA; najczęściej są widoczne w komórkach starych, degenerujących.

Związek struktury i funkcji jąderka podkreślają charakterystyczne zmiany morfologii widoczne w patologii jądra. Należą do nich **segregacja jąderkowa** lub **degranulacja** wywołane zahamowaniem transkrypcji lub dojrzewania rRNA. Zaburzenia metabolizmu rRNA są wywoływane przez różnorodne czynniki fizyczne i chemiczne, np. promieniowanie jonizujące, aktynomycynę D, szok hipertoniczny, niektóre leki.

Odczytywanie informacji genetycznej

W DNA jest zapisana zakodowana w sekwencji nukleotydów informacja, dotycząca białek zarówno strukturalnych, jak i czynnościowych, różnych klas RNA oraz sekwencji regulacyjnych poszczególnych genów. Ekspresja tej informacji odbywa się dwuetapowo. Pierwszy etap (po rozpleceniu helisy) obejmuje przepisanie sekwencji nukleotydów DNA na **informacyjny RNA** (ang. mRNA – *messenger RNA*), nosi nazwę **transkrypcji** i odbywa się w obszarze jądra komórkowego. W następnym etapie, odbywającym się w cytoplazmie, kolejność nukleotydów mRNA zostaje przetłumaczona na sekwencję aminokwasów w łańcuchu polipeptydowym. Ten proces nosi nazwę **translacji** i zachodzi na rybosomach z udziałem tRNA, rRNA i białek.

Transkrypcja RNA

Jest procesem enzymatycznej syntezy RNA odbywającym się na matrycy DNA. DNA determinuje kolejność umiejscawiania się poszczególnych rybonukleotydów w łańcuchu polinukleotydowym. Deoksyrybonukleotydom ATCG w DNA odpowiadają więc w nici RNA rybonukleotydy UAGC. Zasadniczymi enzymami przeprowadzającymi transkrypcję są polimerazy RNA:

- Pol I – zlokalizowana w jąderku, uczestniczy w transkrypcji sekwencji dla rRNA,
- Pol II – w nukleoplazmie, syntetyzuje pre-mRNA,
- Pol III – również w nukleoplazmie, uczestniczy w transkrypcji pre-tRNA i 5 sRNA.

W procesie transkrypcji obok polimeraz uczestniczy na poszczególnych jej etapach wiele białek pomocniczych. W wyniku transkrypcji powstają długie łańcuchy RNA, tzw. **transkrypty**. Transkrypty jako cząsteczki prekursorowe podlegają modyfikacjom w **procesie dojrzewania** (ang. *processing*).

Etapy transkrypcji

W przebiegu transkrypcji wyróżnia się kilka etapów:

I ETAP – wiązanie Pol przez matrycę; do prawidłowego przebiegu procesu wiązania polimerazy z matrycą niezbędne są dodatkowe białka, związane **czynnikami transkrypcyjnymi** (ang. TF, *transcription factor*). Stanowią one dużą grupę czynników białkowych przypisanych do określonej polimerazy (I, II lub III) oraz odpowiednio oznaczonych: A, B, C, D; np. TF IIC. Polimeraza II syntetyzuje także snRNA niezbędne do usuwania intronów z pierwotnych transkryptów. W pierwotnym transkrypcie pre-mRNA na końcu 5′ znajduje się struktura, tzw. czapeczka, utworzona przez GTP.

II ETAP – inicjacja transkrypcji – odbywa się w miejscu startu transkrypcji (ang. *TSS, transcriptional start site*), przylegającym do obszaru regulatorowego zwanego promotorem. Jest to sekwencja składająca się z kilkudziesięciu

do ok. 200 nukleotydów, zawierająca charakterystyczną sekwencję TATA. Rdzeń promotora zawiera miejsca wiązania elementów maszynerii transkrypcyjnej. Wyspecjalizowane czynniki transkrypcyjne rdzenia promotora, ulokowane w pobliżu sekwencji TATA, indukują tworzenie **kompleksu preinicjacyjnego** (ang. *PIC, preinitiation complex*) (ryc. 1.10). W regulacji transkrypcji, jej szybkości oraz czasu trwania uczestniczą regiony regulacyjne nasilające ten proces, zwane **wzmacniaczami** (ang. *enhancers*), oraz osłabiające, zwane **wyciszaczami** (ang. *silencer*). Aktywacja sekwencji wzmacniacza w wyniku interakcji z czynnikami transkrypcyjnymi przemieszcza go w pobliże rdzenia promotora, uruchamiając transkrypcję.

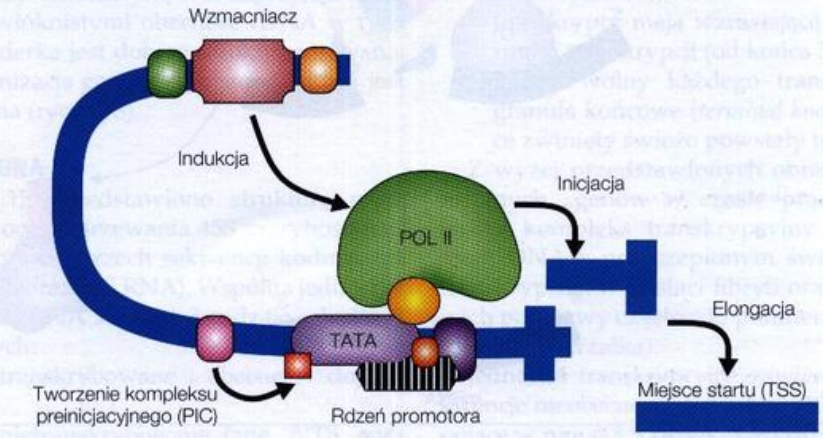
III ETAP – to proces elongacji, czyli wydłużania się łańcucha polinukleotydowego, w czasie którego powstają kolejne wiązania fosfodwuestrowe między nukleotydami.

IV ETAP – zakończenie transkrypcji. Sygnałem do zakończenia transkrypcji są charakterystyczne sekwencje AAUAAA odczytywane przez polimerazę. 10–30 nukleotydów za nimi w kierunku końca 3′ znajduje się miejsce poliadenylacji, czyli miejsce przyłączenia sekwencji poli A.

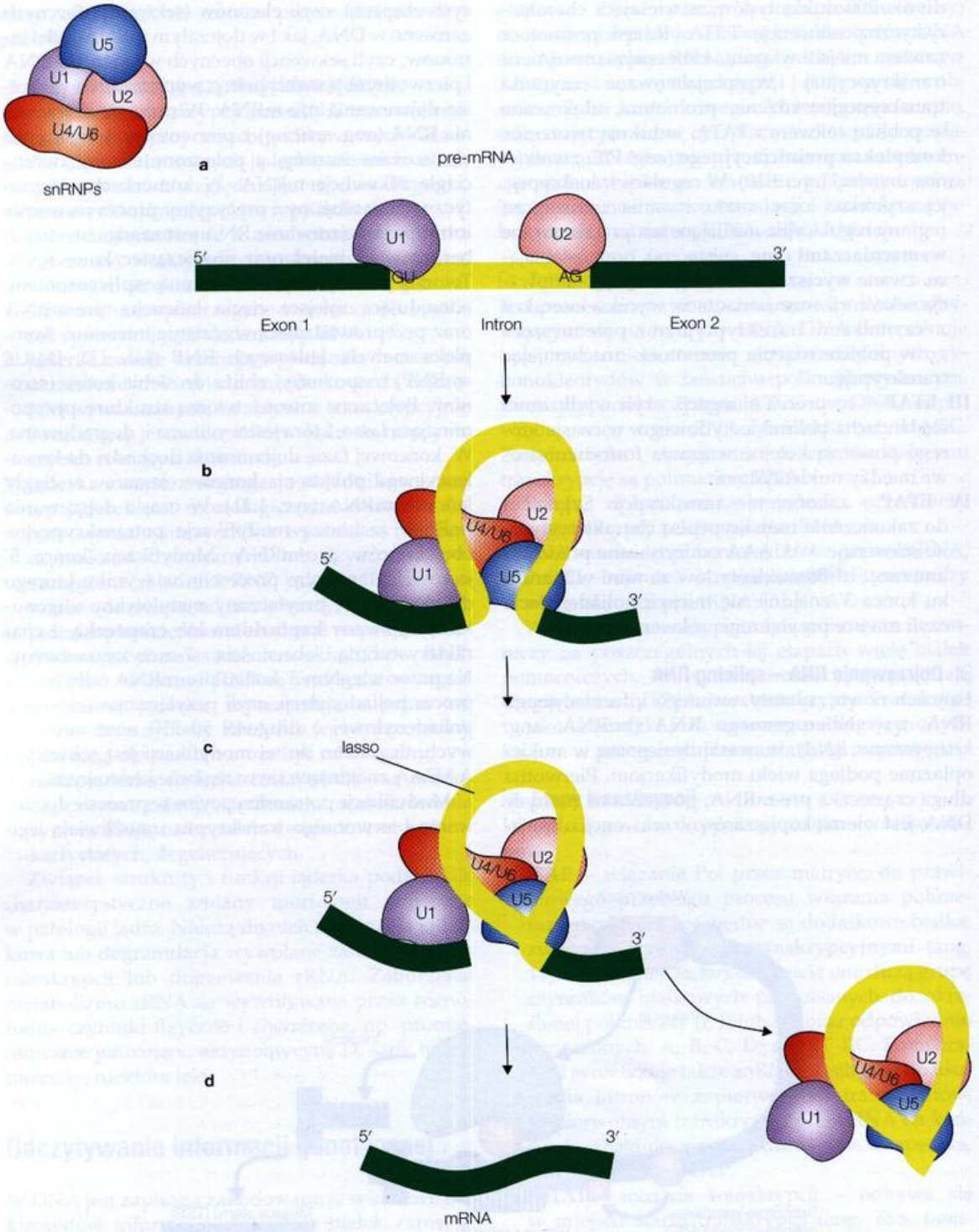
Dojrzewanie RNA – splicing RNA

Łańcuch nowo zsyntetyzowanego informacyjnego RNA, tzw. **heterogennego RNA** (hnRNA, ang. *heterogeneous RNA*), w czasie transportu w nukleoplazmie podlega wielu modyfikacjom. Pierwotna długa cząsteczka pre-mRNA, powstała na matrycy DNA, jest wierną kopią zarówno sekwencji ulegających ekspresji, czyli **eksonów** (sekwencji obecnych zarówno w DNA, jak i w dojrzałym mRNA), jak i intronów, czyli sekwencji obecnych w łańcuchu DNA i pierwotnym transkrypcie, a wycinanych w procesie dojrzewania pre-mRNA. W procesie dojrzewania RNA (ang. *splicing*) z pierwotnego transkryptu są usuwane introny, a połączone eksony tworzą ciągłą sekwencję mRNA. W komórkach eukariotycznych w złożony i precyzyjny proces usuwania intronów i dojrzewanie RNA jest zaangażowanych bardzo wiele białek oraz niskocząsteczkowe RNA. Tworzą one maszynerię zwaną **spliceosomem**, odnajdującą miejsce cięcia łańcucha pre-mRNA oraz przeprowadzającą wycinanie intronów. Kompleks małych, jądrowych RNP (U1, U2, U4/U6 sn RNP) rozpoznaje i zbliża do siebie końce intronów. Połączone introny tworzą strukturę przypominającą lasso, która jest wycinana i degradowana. W końcowej fazie dojrzewania dochodzi do kowalencyjnego połączenia końców eksonów w ciągły łańcuch mRNA (ryc. 1.11). W czasie dojrzewania hnRNA zachodzą modyfikacje potranskrypcyjne obu końców pre-mRNA. Modyfikacja końca 5′ jest wieloetapowym procesem, w wyniku którego do mRNA jest przyłączany metylowany oligonukleotyd, zwany **kapturkiem** lub **czapeczką**, z charakterystyczną obecnością 7-metyloguanozyny. Na przeciwległym 3′ końcu pre-mRNA odbywa się proces poliadenylacji, czyli przyłączania sekwencji poliadenylowej o długości 50–250 reszt adenylowych. Sygnałem do tej modyfikacji jest sekwencja AAUAA znajdująca się w regionie końcowym.

Modyfikacje potranskrypcyjne w procesie dojrzewania pierwotnego transkryptu umożliwiają jego



Rycina 1.10 Struktura i mechanizm działania kompleksu transkrypcyjnego. TSS (*transcriptional start site*) – miejsce startu transkrypcji, PIC (*pre-initiation complex*) – kompleks preinicjacyjny.



Rycina 1.11 Mechanizm dojrzewania mRNA: **a** – pre-mRNA, **b** – spliceosom odnajduje miejsca cięcia między eksonem a intronem, **c** – zbliżanie końców i wycinanie intronu, **d** – połączenie eksonów w ciągłym mRNA, usunięcie i degradacja intronu (zmodyfikowane wg B. Alberts).

przemieszczenie z jądra do cytoplazmy (ryc. 1.11) oraz odczytanie na rybosomach zawartej w nim informacji genetycznej.

Redagowanie RNA

Przynajmniej niektóre transkrypty mogą podlegać procesowi redagowania. Podczas tego procesu transkrypt traci albo zwiększa liczbę nukleotydów. Proces ten postępuje od końca 3′ w kierunku 5′. W jego wyniku mogą powstać nowe ramki odczytu, obejmujące trójki nukleotydów kodujące inne aminokwasy, w zależności od którego nukleotydu rozpocznie się proces odczytywania informacji. W redagowaniu RNA uczestniczą krótkie, tzw. **korygujące sekwencje RNA** (ang. *guide RNA, gRNA*). Redagowanie RNA jest jednym z mechanizmów regulacji ekspresji genów.

Biogeneza rybosomów

Lokalizacja transkrypcji

Podstawowa funkcja jąderka jest związana z syntezą rRNA. W tej powszechnie występującej w komórkach eukariotycznych organelli komórkowej odbywa się transkrypcja prekursorów rRNA, ich dojrzewanie związane z obróbką pierwotnych transkryptów, tworzenie RNA jąderkowych oraz pierwsze etapy transportu podjednostek rybosomów do cytoplazmy. O dużym zapotrzebowaniu komórek eukariotycznych świadczy liczba kopii genów kodujących rRNA (rDNA) w jądrze, która może sięgać nawet do 10 000. W komórkach wątrobowych człowieka znajduje się kilkaset kopii genów rRNA. Od chwili wykrycia strukturalnej ciągłości między chromatyną wewnątrzjąderkową a ośrodkami włóknistymi obecność rDNA w tych strukturach jąderka jest dobrze udokumentowana. Również organizacja genów kodujących rRNA jest dobrze poznana (ryc. 1.13).

Struktura rDNA

Na rycinie 1.12 przedstawiono strukturę genu rDNA oraz proces dojrzewania 45S prerybosomalnego prekursora dla trzech sekwencji kodujących rRNA (18S, 5,8S oraz 28S RNA). Wspólna jednostka transkrypcyjna rDNA zawiera 3 rodzaje sekwencji nukleotydowych:

1. sekwencje transkrybowane i obecne w dojrzałym rRNA,
2. sekwencje nietranskrybowane (ang. NTS, *non-transcribed spacers*) rozdzielające poszczególne jednostki transkrypcyjne w tandemach,
3. sekwencje transkrybowane i obecne w pierwotnym transkrypcie, które zostają wycięte podczas wstępnej obróbki w procesie dojrzewania. Są to wewnętrzne sekwencje transkrybowane (ang. ITS – *internal transcribed spacers*) i zewnętrzne sekwencje transkrybowane (ang. ETS – *external transcribed spacers*).

Sekwencje kodujące rRNA oraz ITS i ETS tworzą jednostkę transkrypcyjną. W obrębie NTS są zlokalizowane sekwencje regulujące funkcję rDNA. Jak wyżej wspomniano, synteza pre-rRNA odbywa się między chromatyną wewnątrzjąderkową a DFC jąderka. Gęsty składnik włóknisty jąderka zawiera 45S pre-rRNA o długości 14 kz. Z analizy cytochemicznej DFC wynika, iż prekursorowa cząsteczka rRNA odpowiada jednostce transkrypcyjnej uwidocznionej po rozproszeniu chromatyny (zob. niżej). W GC jest zawarty natomiast 28 S pre-rRNA. Składnik DFC i GC jąderka reprezentują więc kolejne stadia tworzenia prerybosomów, odzwierciedlając w transformacji DFC w GC proces dojrzewania pre-rRNA.

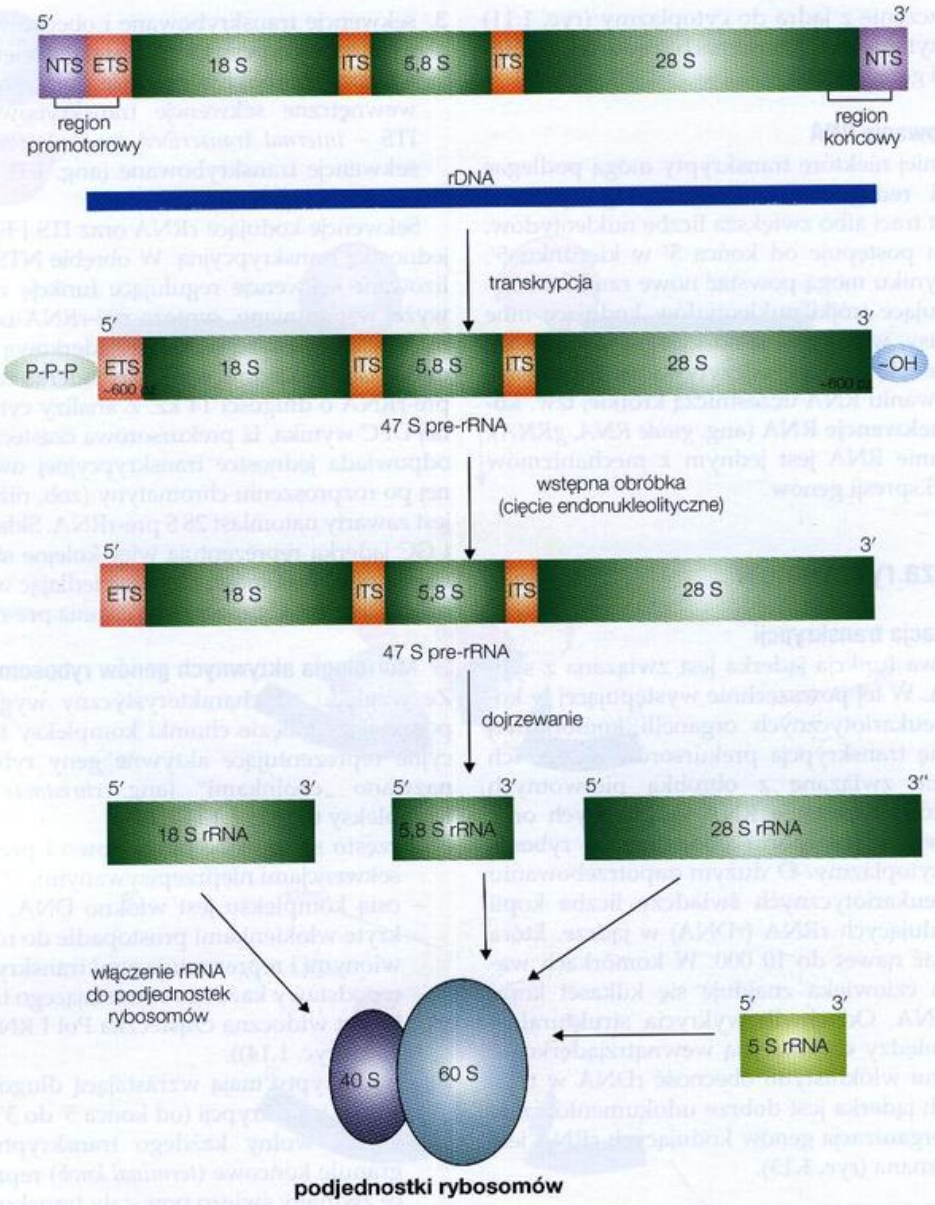
Morfologia aktywnych genów rybosomowych

Ze względu na charakterystyczny wygląd przypominający gałęzie choinki kompleksy transkrypcyjne reprezentujące aktywne geny rybosomalne nazwano „choinkami" (ang. *christmas tree-like*). Kompleksy te (ryc. 1.13 i 1.14):

- często są ułożone tandemowo i przedzielone sekwencjami nieprzepisywanymi,
- osią kompleksu jest włókno DNA, gęsto pokryte włókienkami prostopadle do niego ustawionymi i reprezentującymi transkrypty,
- u podstawy każdego wzrastającego transkryptu jest widoczna cząsteczka Pol I RNA (strzałka na ryc. 1.14)),
- transkrypty mają wzrastającą długość w kierunku transkrypcji (od końca 5′ do 3′),
- koniec wolny każdego transkryptu tworzą granule końcowe (*terminal knob*) reprezentujące zwinięty świeżo powstały transkrypt.

Z wyżej przedstawionych obrazów ultrastrukturalnych „genów w czasie pracy" wynika, że każdy kompleks transkrypcyjny obejmuje fragment DNA z przyczepionym świeżo powstałym transkryptem w postaci fibryli oraz znajdujące się u ich podstawy cząsteczki polimerazy I RNA (zob. ryc. 1.14 – strzałka).

Jednostki transkrypcyjne zawierają zarówno sekwencje nieobecne w dojrzałym rRNA, jak i występujące w nim (18 S rRNA, 5,8 S rRNA i 28 S rRNA). Po transkrypcji w czasie dojrzewania pre-rRNA cząsteczka 45 S łączy się z białkami rybosomowymi,



Rycina 1.12 Struktura genu rDNA (zmodyfikowane wg B. Alberts).

tworząc kompleks RNP, z którego w wielu następnych modyfikacjach potranskrypcyjnych w obszarze jądra powstają podjednostki rybosomów (małe 40 S i duże 60 S). Po ich przeniesieniu przez nukleopory do cytoplazmy tworzą rybosomy. Biogeneza rybosomów jest więc bardzo dobrą ilustracją związków struktury i funkcji jąderka na poziomie submikroskopowym.

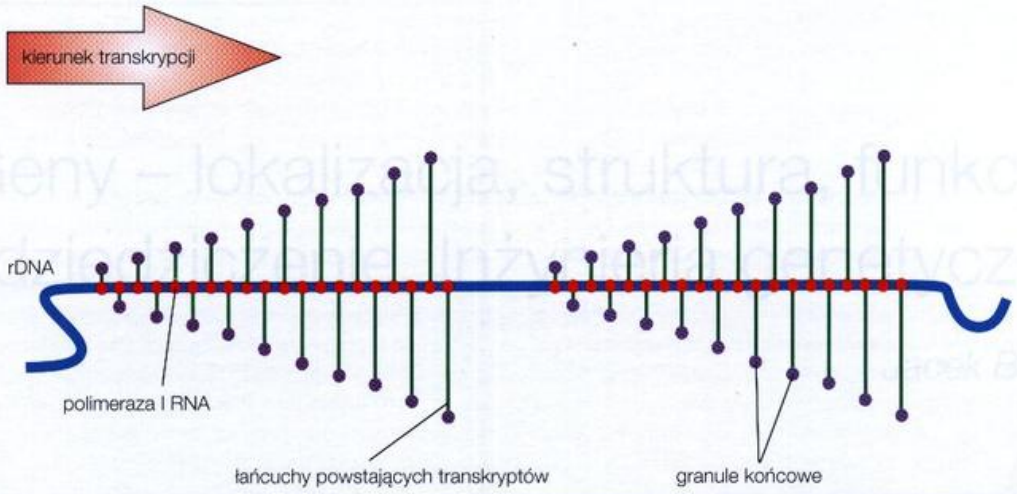
Piśmiennictwo

Alberts B., Bray D.: *Podstawy biologii komórki*. Wyd. Nauk. PWN, Warszawa 1999, rozdz. 6 i 7, 184–242.

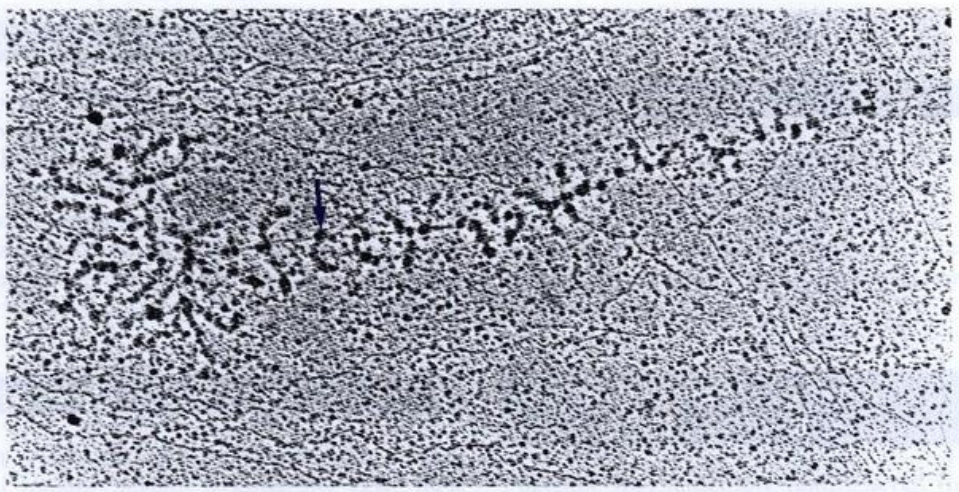
Bal J.: *Badania molekularne i cytogenetyczne w medycynie*. Wyd. Nauk. PWN, Warszawa 1998, rozdz. 2, 16–31.

Godula J.: *Funkcjonalna organizacja osłonki jądrowej*. Post. Biol. Kom. 1997, 24, 29–47.

Grünwald D., Singer R., Rout M.: *Nuclear export dynamics*



Rycina 1.13 Struktura rybosomowych kompleksów transkrypcyjnych.



Rycina 1.14 Ultrastruktura jąderkowego kompleksu transkrypcyjnego po zupełnym rozproszeniu chromatyny (materiał własny autora).

of RNA-protein complexes. Nature, 2011, vol. 475, 333–341.

Hernandez-Verdun D.: *Nucleolus: from structure to dynamics.* In: Histochemistry and cell biology, Springer, Berlin, 2006, 125, 127–137.

Kłyszejko-Stefanowicz L.: *Cytobiochemia.* Wyd. Nauk. PWN, Warszawa 1995, 293–493.

Pance A.: *Tailoring the Models of Transcription.* Int. J. Mol. Sci. 2013, 14,7583–7597.

Sekimoto T., Yoneda Y.: *Intrinsic and extrinsic negative regulator of nuclear protein transport processes.* Genes to Cells, 2012, 17, 525–535.

Trzeciak A., Błasiak J.: *Naprawa DNA w komórkach ssaków.* Post. Biol. Kom. 1999, 26, 4, 707–729.

Węgleński P.: *Genetyka molekularna.* Wyd. Nauk. PWN, Warszawa 1998, rozdz. 8, 226–247.

ROZDZIAŁ 2

Geny – lokalizacja, struktura, funkcja, dziedziczenie. Inżynieria genetyczna

Jacek Bigda

HASŁA

Chromatyna i chromosomy

DNA obecne w jądrze znajduje się w chromosomach, dwuniciowych cząsteczkach DNA połączonych z białkami. Chromatyna jest wysoko uporządkowanym kompleksem DNA i białek. Podlega zmianom polegającym na kondensacji i dekondensacji w czasie cyklu życiowego komórki, co wpływa na wydajność transkrypcji informacji genetycznej zawartej w DNA.

Organizacja i funkcjonowanie genów

Geny są odcinkami DNA kodującymi odrębne jednostki transkrypcyjne. U eukariota geny mają charakter rozproszony i składają się z odcinków kodujących białko – eksonów, oraz odcinków niekodujących – intronów. DNA intronów zawiera liczne powtórzenia określonych sekwencji DNA.

Kontrola ekspresji genów

Procesy regulacyjne wpływające na wydajność transkrypcji i translacji informacji zawartej w kwasach nukleinowych nazywa się kontrolą ekspresji genu. Najważniejszym etapem kontrolnym jest regulacja transkrypcji, która odbywa się głównie przez modulację aktywności czynników transkrypcyjnych wiążących się ze swoistymi odcinkami genów, tzw. sekwencjami promotorowymi i wzmacniającymi.

Zmienność genetyczna

Źródłem zmienności genetycznej zarówno międzygatunkowej, jak i międzyosobniczej jest odmienność genomów. Różnice między genomami powstają wskutek mutacji genów bądź losowej segregacji puli genów w czasie powstawania komórek płciowych.

Analiza i modyfikacja genów. Inżynieria genetyczna

Poznanie mechanizmów regulujących funkcję genów umożliwiło opracowanie metod analizy kwasów nukleinowych oraz ich enzymatycznej syntezy i modyfikacji. Wiedza o mechanizmach przekazywania informacji genetycznej drobnoustrojów pozwoliła na rozpowszechnienie technik klonowania genów. Współczesna inżynieria genetyczna umożliwia nie tylko modyfikację poszczególnych genów, wprowadzanie ich do drobnoustrojów, nadprodukcję białek w układach heterologicznych, ale także powstawanie zwierząt transgenicznych, mających nowe geny i pozbawionych określonych genów (myszy *knockout*).

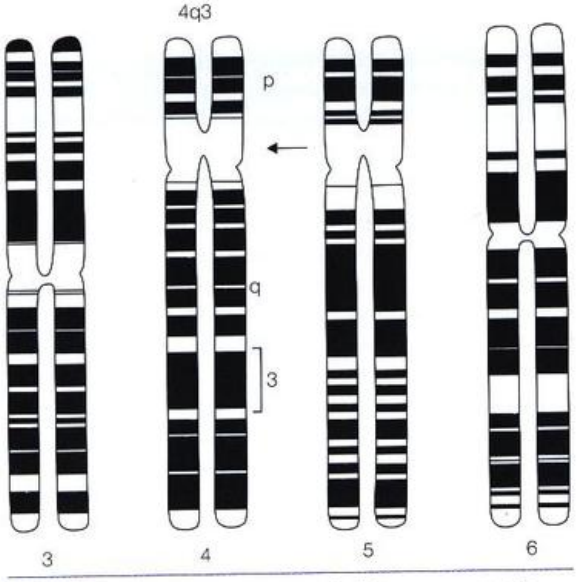
Chromatyna i chromosomy

Chromosomy

DNA obecne w jądrze znajduje się w chromosomach. Każdy z nich stanowi jedną cząsteczkę dwuniciowego DNA występującego w kompleksie z białkami. Kompleks DNA–białka jest określany jako chromatyna. Stopień upakowania kompleksu, czyli kondensacja chromatyny, jest różny w zależności od tego, czy komórka znajduje się w okresie międzypodziałowym, czy w czasie podziału. W każdej somatycznej komórce ludzkiej znajduje się 46 chromosomów: 22 pary chromosomów homologicznych oraz chromosomy płciowe – X i Y u mężczyzn lub para chromosomów homologicznych X u kobiet. W parze chromosomów homologicznych jeden pochodzi od matki, drugi od ojca. U mężczyzn chromosom X pochodzi od matki, a chromosom Y od ojca.

Chromosom mitotyczny

Stan kondensacji chromosomów zmienia się podczas cyklu komórkowego (zob. rozdz. 3), który składa się z okresu międzypodziałowego (interfazy) oraz podziału komórkowego – mitozy (ryc. 2.1). W procesie tym dochodzi do podziału materiału genetycznego na dwie potomne komórki. Przed mitozą DNA chromosomu podlega podwojeniu – replikacji, wskutek czego powstają dwie chromatydy siostrzane. W czasie mitozy chromosomy są silnie skondensowane, a chromatydy siostrzane są połączone w obrębie sekwencji DNA określanych jako centromer. Centromery są punktem przyczepu dla kompleksu białkowego, kinetochoru, który umożliwia rozdzielenie chromosomów przez wrzeciono kariokinetyczne do komórek potomnych. W chromosomach występują również charakterystyczne sekwencje DNA, określane jako **telomery**, znajdujące się na każdym z końców chromosomu. Charakteryzują się występowaniem wielu kopii sekwencji GGGGTTA. Są niezbędne do pełnej replikacji nici opóźnionej DNA z udziałem rybonukleoproteidu telomerazy. Działanie tego enzymu zapobiega skracaniu chromosomów w czasie kolejnych podziałów komórkowych. Sekwencje telomerowe stabilizują ponadto DNA i chronią chromosomy przed działaniem nukleaz.



Rycina 2.1 Chromosomy mitotyczne człowieka oraz oznaczanie miejsca w chromosomie (chromosom 4, ramię krótkie p, ramię długie q, miejsce 3).

Chromosom interfazowy

Chromosomy w okresie międzypodziałowym komórki znajdują się w stanie rozproszonym. Znacznie trudniej są wówczas identyfikowane poszczególne chromosomy. Stwierdzono, że w okresie interfazy chromosomy zajmują oddzielne **terytoria** w jądrze komórkowym. Prawdopodobnie włókna chromatynowe tworzą w tym okresie pętle związane z matriks jądrowym. Przymocowanie do otoczki jądrowej i swoista lokalizacja w obrębie jądra najprawdopodobniej zapobiegają splątaniu chromosomów, co mogłoby utrudniać przygotowanie do podziału komórkowego. W interfazie zachodzi aktywna transkrypcja informacji genetycznej oraz replikacja DNA chromosomów. Wyrazem transkrypcji zachodzącej aktywnie w określonych obszarach jądra może być istnienie tzw. plamek (ang. *speckles*), występujących w liczbie ok. 20–50, identyfikowanych na podstawie barwienia przeciwciałami rozpoznającymi m. in. czynniki zaangażowane w proces składania RNA.

Heterochromatyna i euchromatyna

Chromatyna interfazowa jest skondensowana w sposób niejednorodny. Istnieją obszary chromatyny silnie skondensowane, widoczne pod mikroskopem elektronowym (ME) jako ciemne pola chromatyny, określane jako **heterochromatyna,** oraz obszary chromatyny rozproszonej – **euchromatyny**. Heterochromatyna stanowi nieaktywne DNA transkrypcyjne, znajdujące się głównie wokół centromerów chromosomów oraz na ich końcach. Przykładem heterochromatyny jest inaktywowany chromosom X w komórkach żeńskich. Euchromatyna jest aktywna transkrypcyjnie, podlega naj-

prawdopodobniej przynajmniej częściowemu rozwinięciu nukleosomów oraz odłączeniu od matriks jądrowego, co umożliwia przyłączenie kompleksu białek zaangażowanych w transkrypcję informacji zawartej w DNA. W procesach kondensacji i dekondensacji chromatyny ważną rolę odgrywa chemiczna modyfikacja białek histonowych – defosforylacja histonu H1 oraz acetylacja histonów rdzeniowych. Są to procesy sprzyjające transkrypcyjnej aktywności chromatyny. Cechą chromatyny aktywnej transkrypcyjnie jest jej nadwrażliwość na trawienie nukleazami. Rozcinają one odsłonięte odcinki DNA, odpowiedzialne za wiązanie m. in. czynników białkowych zaangażowanych w regulację transkrypcji.

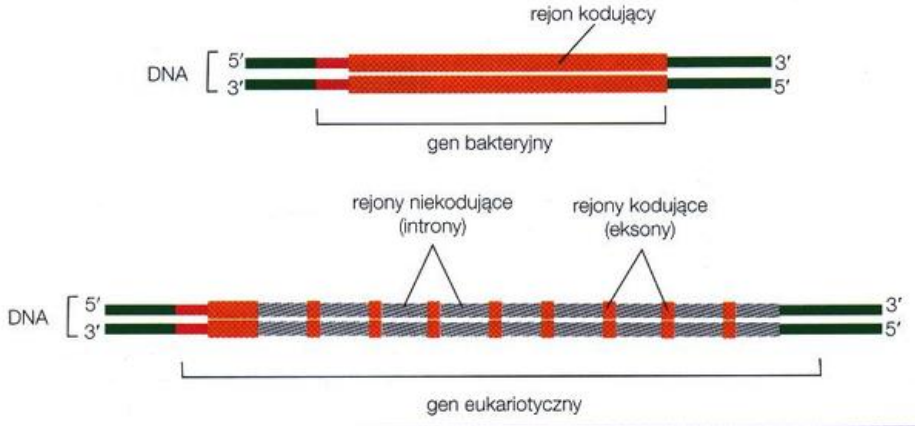
Organizacja i funkcjonowanie genów

Geny

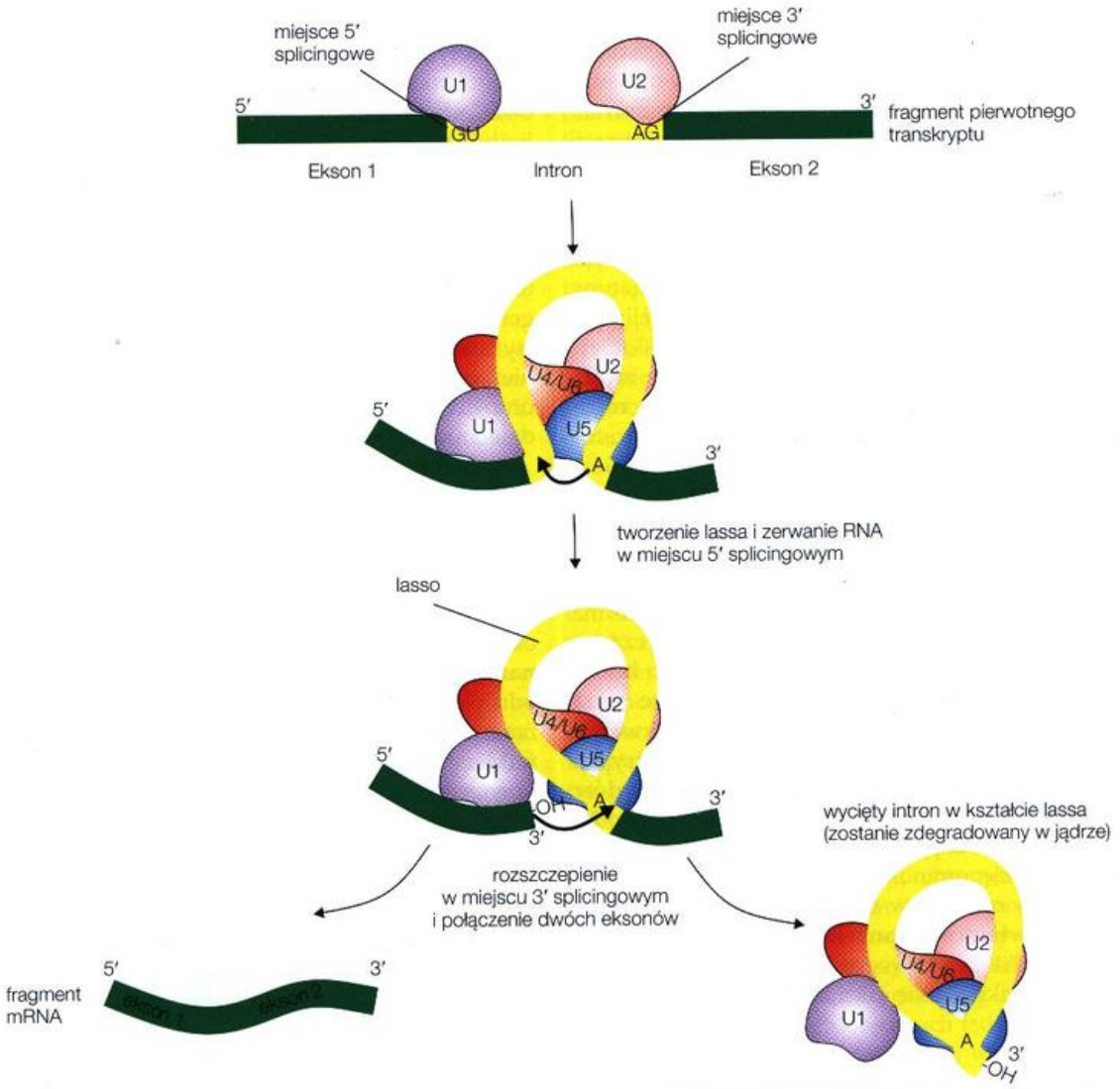
W sekwencji nukleotydów DNA jest zapisana informacja o budowie cząsteczek białek i cząsteczek RNA, a więc kompletna informacja o budowie i funkcji każdej komórki. Na obszarze jądra komórkowego informacja zapisana w sekwencji DNA jest przepisywana w procesie transkrypcji na informację zawartą w sekwencji nukleotydów RNA. Następnie, już w cytoplazmie, dochodzi do przepisania w procesie translacji sekwencji RNA na sekwencję aminokwasów określonego białka. Informacja zawarta w matrycowym RNA dyktuje kolejność wbudowywania kolejnych aminokwasów do łańcucha białkowego. Reguły przepisywania informacji określa się jako **kod genetyczny**, który opiera się na zasadzie odczytywania zestawu trzech nukleotydów (kodonów) kodujących poszczególne aminokwasy. **Gen** można określić jako odcinek DNA obejmujący jedną jednostkę transkrypcyjną kodującą określony polipeptyd lub polipeptydy powstające wskutek dojrzewania RNA lub prekursora białkowego. Gen może również kodować RNA niepodlegające przepisaniu w procesie translacji, ale wpływające regulująco na proces transkrypcji innych genów. Należy podkreślić, że dla funkcji genu jako elementu determinującego charakterystyczne dziedziczne cechy gatunkowe i osobnicze niezwykle istotna jest szczególna budowa DNA, umożliwiająca jego precyzyjne powielanie i rozdzielanie do komórek potomnych.

Mozaikowa organizacja genów u eukariota

W przeciwieństwie do komórek prokariotycznych, geny u eukariota mają charakter mozaikowy, rozproszony (ryc. 2.2 i 2.3). Oznacza to, że sekwencje DNA kodujące białko (**eksony**) są przerywane odcinkami DNA niekodującymi aminokwasów (**intronami**). Po procesie transkrypcji określonych genów odcinki RNA odpowiadające intronom są wycinane z udziałem kompleksów małych jądrowych nukleoprotein (ang. snRNP – *small nuclear ribonucleoprotein*) jeszcze przed eksportem RNA z jądra. Proces cięcia i łączenia transkrybowanego RNA jest określany mianem obróbki lub dojrzewania (ang. *splicing*). Introny mają najczęściej długość 80–10 000 nukleotydów. Wśród sekwencji niekodujących białek należy wyróżnić odcinki DNA kodujące różnorodne **odcinki RNA o funkcjach regulacyjnych.** Jednym z rodzajów takich cząsteczek są **mikroRNA,**



Rycina 2.2 Porównanie genu bakteryjnego z genem eukariotycznym. Bakteryjny gen zawiera nieprzerwaną sekwencję nukleotydów kodujących aminokwasową sekwencję białka. Natomiast w większości genów eukariotycznych sekwencje kodujące (eksony) są poprzerywane sekwencjami niekodującymi (intronami). Miejsca promotorowe zaznaczono kolorem różowym (zmodyfikowane wg B. Alberts).

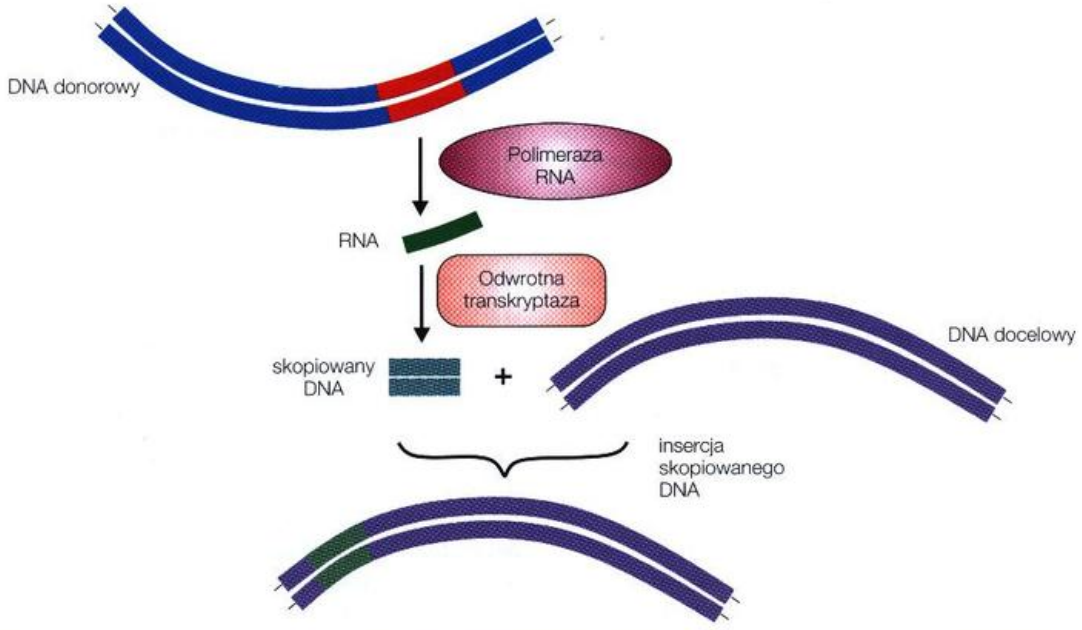


Rycina 2.3 Mechanizm dojrzewania (*splicing*) RNA. Dojrzewanie RNA jest katalizowane przez kompleks zbudowany z snRNP (na rysunku przedstawiono je w formie kół) oraz innych białek (nie uwidocznionych na rycinie), razem tworzących spliceosom. Jedna z funkcji spliceosomu polega na zbliżeniu do siebie dwóch końców intronu, co umożliwia reakcję. Po związaniu się snRNP z odpowiednimi miejscami pre-mRNA szczególna reszta adeniny atakuje miejsce splicingowe 5′ i zrywa w tym miejscu łańcuch cukrowo-fosforanowy RNA. Koniec 5′ odciętego intronu zostaje kowalencyjnie połączony z nukleotydem adenylowym, tworząc w cząsteczce RNA pętlę, określaną jako lasso. Wolna grupa OH na końcu 3′ pierwszego eksonu reaguje następnie z początkiem sekwencji drugiego eksonu, jednocześnie uwalniając koniec 3′ intronu i kowalencyjnie łącząc dwa eksony. Końcowym wynikiem reakcji splicingu jest połączenie eksonów w jedną ciągłą sekwencję kodującą oraz usunięcie w kształcie lassa intronu, który zostaje zdegradowany (zmodyfikowane wg B. Alberts).

krótkie jednoniciowe odcinki RNA **regulujące ekspresję innych genów,** zaangażowane w proces degradacji określonych matrycowych RNA.

Powtarzające się sekwencje DNA

DNA niekodujący białek w przeważającej części składa się z wielokrotnych powtórzeń określonych sekwencji DNA (ryc. 2.4). Wskazały na to wyniki badań nad kinetyką reasocjacji pojedynczych nici denaturowanego DNA. Wśród sekwencji powtarzalnych należy wymienić **powtórzenia tandemowe**, czyli sekwencje leżące bezpośrednio jedna za drugą, oraz sekwencje rozproszone, występujące jako wielokrotne kopie w genomie. Powtórzenia



Rycina 2.4 Przemieszczanie się eukariotycznych retrotranspozonów. Transpozony te przemieszczają się, najpierw zostają przepisane na RNA, na podstawie którego następnie tworzona jest kopia dwuniciowego DNA. Kopia DNA ulega insercji w docelowym miejscu cząsteczki DNA. Miejsce docelowe może znajdować się na tej samej cząsteczce DNA, która zawiera sekwencję donorową, lub na innej. Ze względu na podobieństwo tego mechanizmu do replikacji wirusów znanych jako retrowirusy, transpozony tego typu są nazywane retrotranspozonami (zmodyfikowane wg B. Alberts).

tandemowe występują w satelitarnym DNA, identyfikowanym w czasie wirowania w gradiencie chlorku cezu jako DNA o odmiennej gęstości od większości DNA. Zależnie od długości powtórzeń są wyróżniane **minisatelity** (powtórzenia odcinków o długości 9–80 pz o całkowitej długości od kilkuset do 20–30 tys. pz) i **mikrosatelity** (powtórzenia odcinków o długości 1–6 pz o całkowitej długości do 100 pz).

KLINIKA

Ponieważ niektóre z tych sekwencji wykazują znaczną zmienność osobniczą, są wykorzystywane do celów diagnostycznych w medycynie sądowej i badaniach populacyjnych, a dzięki bliskości sekwencji kodujących również jako markery w diagnostyce różnych chorób dziedzicznych.

Sekwencje rozproszone są to odcinki DNA o długości kilkuset–kilku tys. pz powtarzające się tysiące razy. Dwa rodzaje takich sekwencji, określane jako *Alu* oraz L1 (lub *LINE-1*), stanowią ok. 10% genomu człowieka. Sekwencja *Alu* o długości około 300 pz występuje w genomie ludzkim w ok. 500 tysiącach kopii. Sekwencje L1 i *Alu* są przykładem ludzkich **transpozonów**, ruchomych elementów DNA przemieszczających się w obrębie chromosomu. Należą do grupy retrotranspozonów, ponieważ wymagają przepisania na RNA, a następnie na DNA przez enzym syntetyzujący DNA na matrycy RNA, tj. odwrotną transkryptazę (ryc. 2.4). Jest ona kodowana przez element L1 u człowieka. Sekwencje *Alu* podlegają transkrypcji i odwrotnej transkrypcji z RNA do DNA znacznie rzadziej niż sekwencje L1. Rozproszone sekwencje powtarzalne zostały namnożone (amplifikacja) w czasie ewolucji.

Zespoły genów

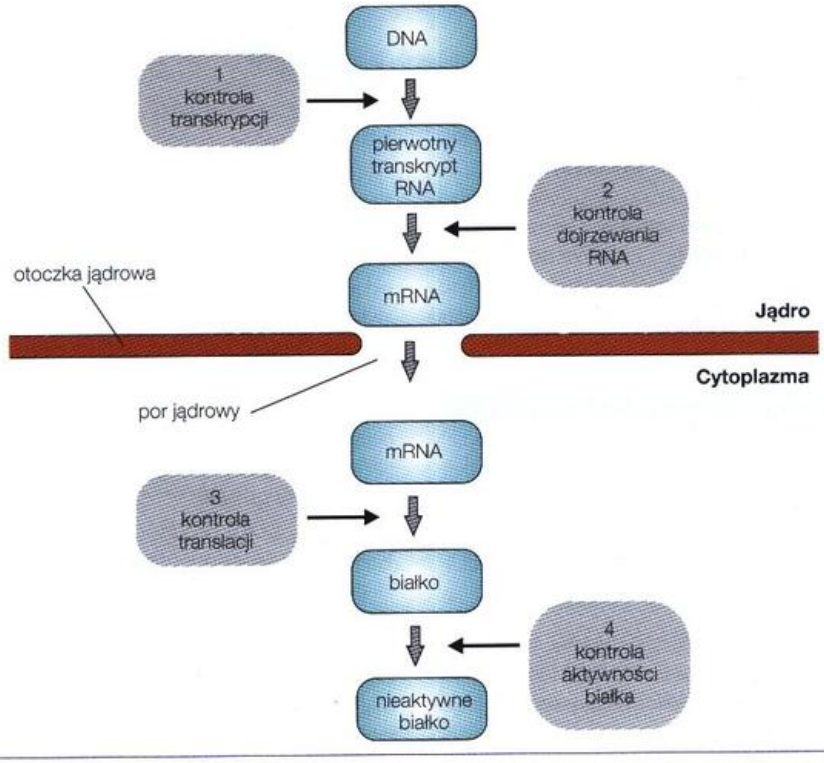
Niektóre geny występują w układzie tandemowym. Przykładem takich genów występujących w zespołach są geny kodujące produkty potrzebne w dużych ilościach, takie jak geny kodujące rybosomalny RNA. U człowieka są zlokalizowane w pięciu chromosomach, w obszarach określanych jako organizator jąderka. W każdym z chromosomów jest około 40 kopii genu kodującego prekursor 45S rRNA. Innym przykładem tandemowych zespołów genowych są geny kodujące białka histonowe.

Kontrola ekspresji genów

Obecność genu w danej komórce nie oznacza pojawienia się jego produktu. Gdy w komórce pojawia się produkt genu, tj. RNA lub/i białka, wówczas mówi się, że dany gen ulega **ekspresji**. Procesy prowadzące do pojawienia się produktu genu, umożliwiające jego ekspresję – **transkrypcja**, dojrzewanie transkryptu i jego transport do cytoplazmy, translacja i dojrzewanie białka – podlegają różnorodnym procesom regulacyjnym, określanym ogólnie jako kontrola ekspresji genu (ryc. 2.5). Spośród etapów regulacji ekspresji genu największe znaczenie ma kontrola procesu transkrypcji, pierwszego z punktów kontrolnych na drodze do powstania aktywnego biologicznie produktu genu.

Regulacja transkrypcji – sekwencje promotorowe i regulatorowe

Podczas inicjacji transkrypcji polimeraza RNA wiąże się z **promotorem**, odcinkiem DNA zlokalizowanym na początku genu, bezpośrednio przed regionem kodującym. Promotory zawierają **miejsce inicjacji**, w którym rozpoczyna się transkrypcja (zwykle pierwszy nukleotyd transkryptu oznacza się jako +1), oraz sekwencję około 50 pz w kierunku 5', której zadaniem jest związanie polimerazy RNA. Zarówno w obrębie promotora, jak i w kierunku 5' mogą się znajdować **sekwencje regulatorowe**. W komórkach bakteryjnych są najczęściej krótkie i nie przekraczają 10 pz. W komórkach eukariotycznych mogą być długie oraz bardzo oddalone od genu, na którego transkrypcję wpływają. Sekwencje regulatorowe powodują aktywowanie lub zahamowanie funkcji promotora i genu. Sekwencje regulatorowe wpływają na transkrypcję przez związanie białek regulatorowych, których przykładami są aktywatory lub **represory** w komórkach bakteryjnych oraz **czynniki transkrypcyjne** w komórkach eukariotycznych. Białka regulatorowe wiążą się ze swoistymi sekwencjami DNA, dopasowując się do przestrzennego układu helisy DNA. W białkach regulatorowych występują struktury przestrzenne warunkujące wiązanie się do DNA. Do tych struktur, określanych jako motywy wiążące DNA, należą struktury – homeodomeny, palce cynkowe oraz zamki leucynowe.

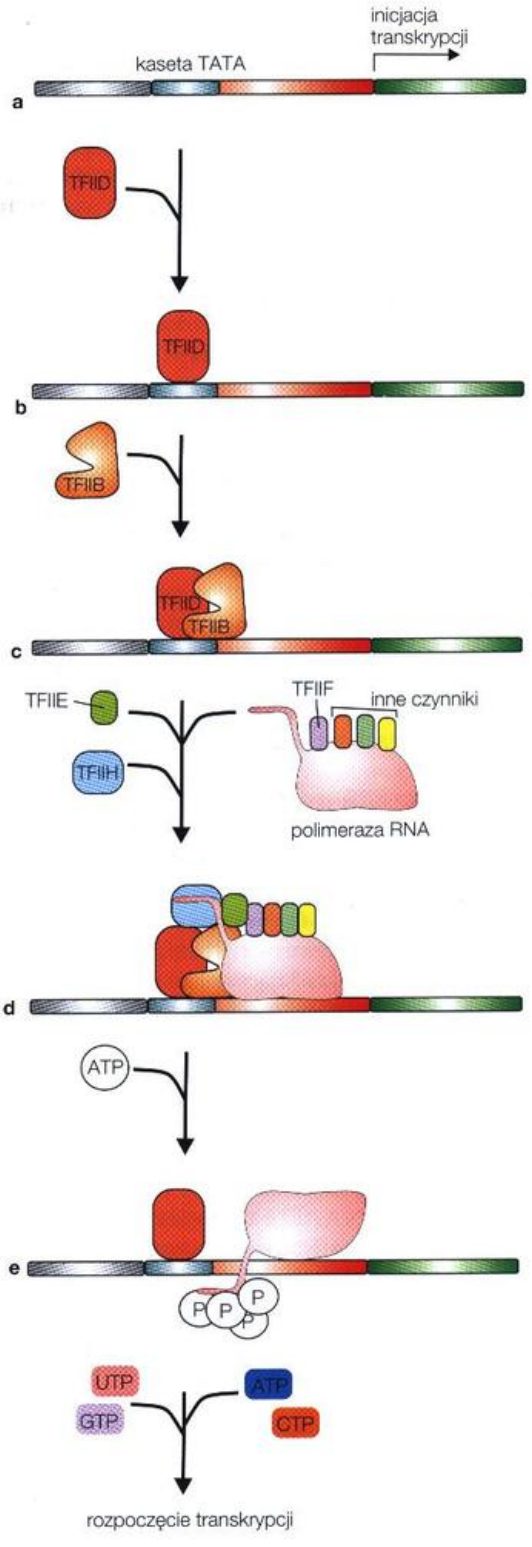


Rycina 2.5 Cztery etapy, na których może zachodzić kontrola ekspresji genów eukariotycznych. Znane są przykłady regulacji genów na każdym z tych etapów, choć większość genów podlega kontroli na pierwszym etapie: transkrypcji DNA na RNA (zmodyfikowane wg B. Alberts).

Oddziałują one z większym rowkiem DNA. Liczne białka regulatorowe występują w postaci dimerów niekiedy różnych podjednostek białkowych.

Regulacja transkrypcji – rola sekwencji promotorowych

Inicjacja transkrypcji w komórkach eukariotycznych wymaga związania z promotorem polimerazy RNA oraz regulatorów białkowych, określanych jako ogólne czynniki transkrypcyjne (zob. podrozdz. *Czynniki transkrypcyjne*) (ryc. 2.6). Są one niezbędne do powstania wszystkich matrycowych RNA. Ogólne czynniki transkrypcyjne wiążą się z sekwencją (kasetą) TATA, występującą w obrębie promotora większości genów eukariotycznych. Kaseta TATA, złożona głównie z nukleotydów T i A, znajduje się w odległości 25–35 nukleotydów powyżej miejsca inicjacji transkrypcji. **Kaseta TATA** jest odpowiedzialna za wiązanie białka TBP (ang. *TATA-binding protein*), wchodzącego w skład kompleksu białkowego TFIID (ang. TF, *transcription factor*, czynnik transkrypcyjny) – jednego z podstawowych, ogólnych czynników transkrypcyjnych. Związanie TFIID z DNA powoduje silne wygięcie DNA i ułatwia przyłączenie kolejnych czynników TFIIB, TFIIE, TFIIF i TFIIH oraz powstanie kompleksu inicjującego transkrypcję. Fosforylacja polimerazy RNA przez jeden ze składników kompleksu TFIIH umożliwia jej uwolnienie z kompleksu i uruchomienie aktywności katalitycznej. W komórkach



Rycina 2.6 Inicjacja transkrypcji eukariotycznego genu przez polimerazę RNA II. Aby rozpocząć transkrypcję, polimeraza RNA wymaga kilku ogólnych czynników transkrypcyjnych (nazywanych TFIIA, TFIIB itd.): **a** – promotor zawiera sekwencję DNA nazywaną kasetą TATA, która jest oddalona o 25 nukleotydów od miejsca inicjacji transkrypcji, **b** – kasetę TATA rozpoznaje i wiąże czynnik transkrypcyjny TFIID, co umożliwia przyłączenie się obok czynnika TFIIB, **c** – dla uproszczenia na rysunku nie przedstawiono odkształcenia DNA, powstającego w wyniku przyłączenia TFIID, **d** – pozostałe ogólne czynniki transkrypcyjne oraz polimeraza RNA składają się w miejscu promotora, **e** – TFIIH za pomocą ATP fosforyluje polimerazę RNA II, zmieniając jej konformację w taki sposób, że enzym może się uwolnić z kompleksu i rozpocząć transkrypcję. Jak pokazano, miejscem fosforylacji jest długi „ogon" polipeptydowy, wystający poza cząsteczkę polimerazy. Właściwy porządek, w jakim ogólne czynniki transkrypcyjne składają się w miejscu promotora, nie został dotąd dokładnie poznany. Istnieje pogląd, że ogólne czynniki transkrypcyjne składają się z polimerazą poza DNA i dopiero cały kompleks wiąże się z DNA. Ogólnie czynniki transkrypcyjne są silnie konserwatywne w ewolucji; niektóre, pochodzące z komórek człowieka czynniki transkrypcyjne można w warunkach eksperymentalnych wymienić na odpowiednie czynniki pochodzące z drożdży (zmodyfikowane wg B. Alberts).

eukariotycznych istnieją również geny pozbawione kaset TATA, w których transkrypcja jest warunkowana wiązaniem czynnika Sp1 do sekwencji promotorowej bogatej w GC (guaninę i cytozynę). Czynnik transkrypcyjny Sp1 może oddziaływać z podstawowym kompleksem transkrypcyjnym w wyniku wiązania z TFIID. Rolę kasety TATA najprawdopodobniej odgrywa element inicjatorowy, znajdujący się w miejscu inicjacji transkrypcji; często zawiera on C w pozycji –1 oraz A w pozycji +1. Do elementu inicjatorowego pośrednio może wiązać się TBP i umożliwiać przyłączanie kolejnych elementów inicjujących transkrypcję, podobnie jak w przypadku klasycznego promotora wyposażonego w kasetę TATA. Promotory pozbawione kasety TATA występują w genach kodujących białka niezbędne do utrzymania stałego poziomu metabolizmu komórkowego, np. enzymy cyklu Krebsa. Cechą charakterystyczną tych genów jest stały (uporządkowany) poziom transkrypcji, stąd określa się je jako geny utrzymujące porządek, konstytutywne (ang. *house-keeping promoters, genes, proteins*). Innym często występującym elementem regulującym transkrypcję jest blok CCAAT, oddalony 100–200 pz od promotora, występujący w jednej lub wielu kopiach tej sekwencji.

Polimerazy RNA

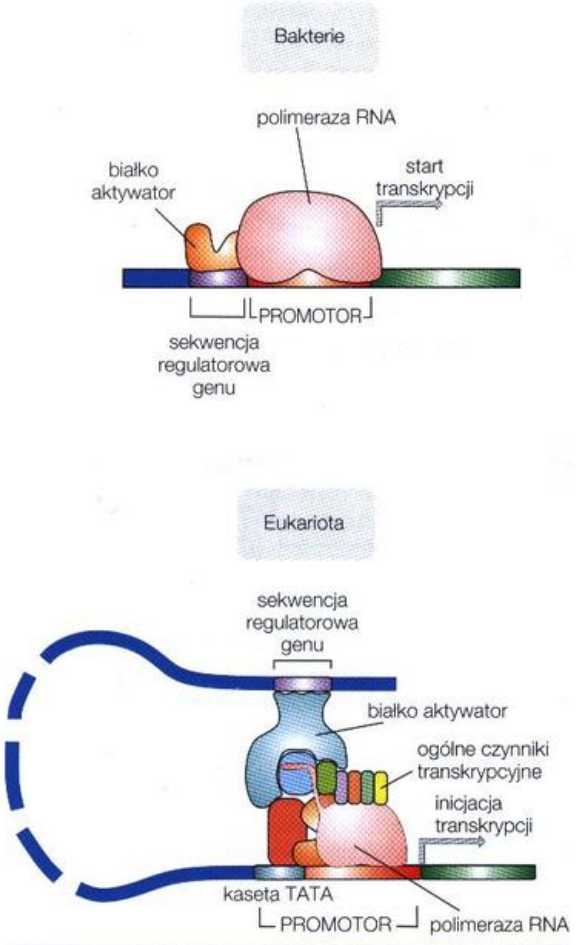
Opisany wyżej schemat procesu inicjacji transkrypcji dotyczy sposobu działania polimerazy RNA II, syntetyzującej prekursory RNA wszystkich genów kodujących białka oraz niektórych małych genów jądrowych RNA. Prekursor RNA podlega następnie dojrzewaniu, składającemu się z: modyfikacji końca 5' poprzez przyłączenie i metylację guanozyny (tworzenie kapu 5'), przyłączenia ogona poliadenylowego do końca 3' oraz wycięcia intronów w procesie dojrzewania. W komórkach eukariotycznych występuje również polimeraza RNA I, syntetyzująca prekursor rybosomowego RNA w jąderku, oraz polimeraza RNA III, syntetyzująca prekursory 5S rRNA, tRNA oraz inne małe jądrowe i cytoplazmatyczne RNA. W transkrypcji prowadzonej przez polimerazę RNA I, obok regionu promotorowego zachodzącego na sekwencję kodującą, ważnym elementem kontrolującym transkrypcję jest region kontrolny UCE (ang. *upstream control element*) zlokalizowany około 60 pz przed promotorem. Do regionu kontrolnego i promotora wiąże się dimeryczne białko UBF (ang. *UCE-binding factor*) ułatwiające następnie wiązanie polimerazy. W wiązaniu enzymu do promotora uczestniczy czynnik selekcyjny SL1, stabilizujący również wiązanie UBF do promotora. Podobnie jak polimeraza RNA I i polimeraza RNA II, także polimeraza RNA III wymaga do swojego działania utworzenia kompleksu z czynnikami białkowymi aktywującymi transkrypcję. W przypadku genów tRNA są to czynniki TFIIIC i TFIIIB, w genach 5S rRNA – czynniki TFIIIA oraz TFIIIB. Odcinek promotorowy dla polimerazy RNA III znajduje się w obrębie sekwencji kodującej. Należy podkreślić, że jedną z podjednostek czynnika SL1, ułatwiającego transkrypcję polimerazy RNA I, oraz jedną z podjednostek czynnika TFIIIB ułatwiającego transkrypcję polimerazy RNA III, jest białko TBP, uczestniczące również w procesie inicjacji transkrypcji katalizowanej przez polimerazę RNA II. Można zatem powiedzieć, że TBP jest podstawowym czynnikiem inicjatorowym transkrypcji eukariotycznych polimeraz RNA.

Regulacja transkrypcji oddalonych genów w komórkach prokariotycznych i eukariotycznych

W obrębie genów bakteryjnych występują operatory, sekwencje regulujące ekspresję genów (ryc. 2.7). Zlokalizowane są w obrębie promotorów genów, wchodząc wraz z promotorem oraz kompleksem genów strukturalnych w skład zespołu genów – **operonu**. Do operatorów, czyli sekwencji regulatorowych, mogą wiązać się białka regulatorowe wpływające na ekspresję genów. Białka represorowe hamują, a aktywatory pobudzają transkrypcję genów. Zdolności regulacyjne represorów i aktywatorów zmieniają się po połączeniu z drobnocząsteczkowymi substancjami, takimi jak: laktoza, tryptofan, cykliczny AMP, umożliwiając komórce bakteryjnej dostosowanie swego metabolizmu do zmieniających się warunków środowiska. W komórkach eukariotycznych sekwencje regulatorowe mogą znajdować się nie tylko w obrębie lub w bezpośredniej bliskości promotorów, ale również w znacznej, przekraczającej niekiedy kilka tysięcy zasad, odległości od miejsca inicjacji transkrypcji. Liczne sekwencje regulatorowe mogą ponadto wpływać regulująco na aktywność tego samego genu, podczas gdy w komórce bakteryjnej kontrola nad ekspresją genu jest sprawowana przez jedną sekwencję regulatorową.

Sekwencje wzmacniające i wyciszające

Sekwencje wzmacniające (ang. *enhancers*) są sekwencjami regulatorowymi, stymulującymi transkrypcję z odległych promotorów. Występowanie sekwencji wzmacniających zaobserwowano po raz pierwszy w genomie wirusa SV40, gdy wykazano,



Rycina 2.7 Podstawowe różnice w mechanizmie aktywacji genów u bakterii i eukariotów. Dodatkowo eukariotyczny DNA jest upakowany w nukleosomy (niepokazane) (zmodyfikowane wg B. Alberts).

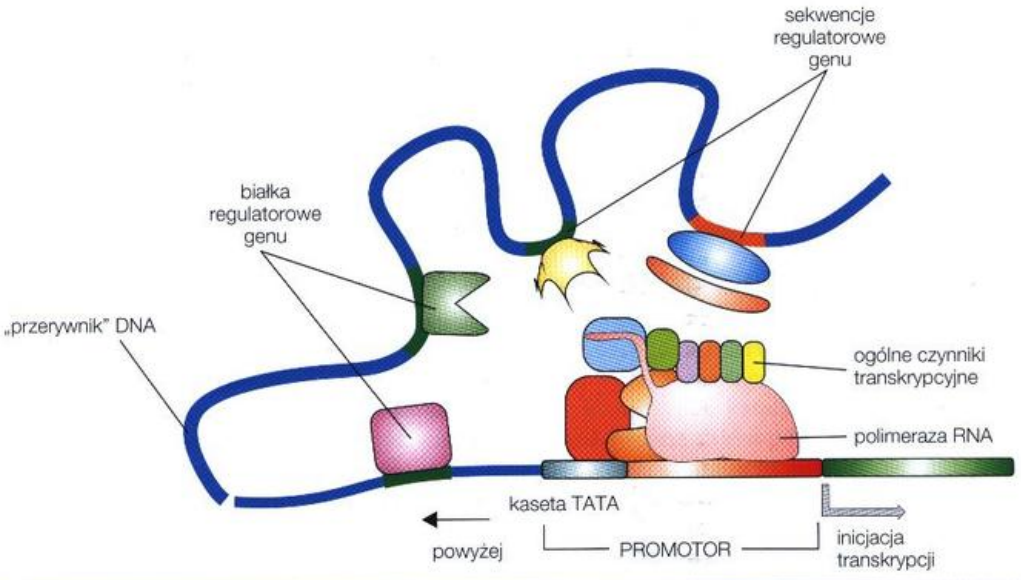
że 72-zasadowy odcinek DNA może modulować transkrypcję niezależnie od jego zmienionej eksperymentalnie lokalizacji w kołowym genomie tego wirusa. Do sekwencji wzmacniających wiążą się białka aktywatorowe, czynniki transkrypcyjne. Sekwencje wzmacniające mogą występować nie tylko przed genem, w jego obrębie, ale również za genem, na którego transkrypcję wywierają wpływ. Sekwencje wzmacniające podlegają regulacji ze strony środowiska zewnętrznego oraz w odpowiedzi na sygnały swoiste dla określonych tkanek. Klasycznym przykładem tkankowo swoistej sekwencji wzmacniającej jest sekwencja występująca w genie kodującym łańcuch ciężki immunoglobulin, której działanie może zwiększyć tysiąckrotnie wydajność transkrypcji genu immunoglobulinowego. Mechanizm działania sekwencji wzmacniających polega najprawdopodobniej na utworzeniu pętli łańcucha DNA między sekwencją wzmacniającą a promotorem i umożliwieniu bezpośredniego oddziaływania czynników transkrypcyjnych znajdujących się w obrębie sekwencji wzmacniającej z kompleksem polimerazy RNA i ogólnych czynników transkrypcyjnych związanych z promotorem. Mechanizm ten tłumaczy również zjawisko kombinatorycznej kontroli ekspresji genu (ryc. 2.8), dzięki któremu różne czynniki transkrypcyjne, związane z różnymi sekwencjami wzmacniającymi, mogą wpływać na ekspresję jednego genu. Obok sekwencji wzmacniających, na proces transkrypcji mogą również wpływać odległe od promotorów **sekwencje wyciszające** (ang. *silencers*). Prawdopodobnie oddziałują przez wiązanie białek hamujących transkrypcję wskutek interakcji z polimerazą RNA lub czynnikami transkrypcyjnymi. Wydaje się, że mogą również działać na poziomie struktury chromatyny i wpływać na silniejsze upakowanie chromatyny w sąsiadujących sekwencjach DNA.

Regulacja transkrypcji a struktura chromatyny

Upakowanie DNA w struktury nukleosomalne może być zachowane w aktywnym transkrypcyjnie DNA. Wydaje się, że w chwili inicjacji transkrypcji następuje przemieszczenie nukleosomów poza sekwencje promotorowe. Biorą w tym udział kompleksy białkowe remodelujące chromatynę w procesie zależnym od ATP oraz kompleksy modyfikujące białka histonowe. Wiązanie białek regulatorowych do sekwencji DNA znajdujących się w obrębie nukleosomów może następować nawet wtedy, gdy DNA zawierający sekwencję wzmacniającą jest nawinięty na rdzeń histonowy. Jest możliwe, że polega to na kompetycyjnym wiązaniu białek regulatorowych i histonowych do DNA zawartego w nukleosomach.

Czynniki transkrypcyjne

Ogólne czynniki transkrypcyjne (ang. TF, *transcription factor*) są niezbędne do inicjacji transkrypcji przebiegającej na podstawowym poziomie. Wiążą się z promotorami i umożliwiają powstanie kompleksu transkrypcyjnego. Czynniki TFIID, TFIIA i TFIIB umożliwiają przyłączenie polimerazy RNA oraz czynnika TFIIF. Do kompleksu polimerazy i wyżej wymienionych czynników dołączają się następne ogólne czynniki transkrypcyjne: TFIIE, TFIIH i TFIIJ, spośród których TFIIH pełni ważną rolę jako wieloskładnikowy kompleks mający ak-



Rycina 2.8 Sekwencje regulatorowe typowego genu eukariotycznego. Promotor jest sekwencją DNA, z którą wiążą się ogólne czynniki transkrypcyjne i polimeraza RNA. Najistotniejszą cechą promotorów genów transkrybowanych przez polimerazę RNA II jest obecność kasety TATA, która służy jako punkt startu do składania się ogólnych czynników transkrypcyjnych (zob. ryc. 2.6). Miejsce, w którym polimeraza RNA rozpoczyna transkrypcję, zwykle znajduje się ok. 25 par nukleotydów poniżej kasety TATA. Sekwencje regulatorowe genu służą jako miejsca przyłączenia białek regulatorowych, których obecność na DNA wpływa na szybkość inicjacji transkrypcji. Sekwencje regulatorowe mogą być położone w sąsiedztwie promotora, daleko powyżej niego, a nawet poniżej genu. Utworzenie pętli DNA pozwala białkom regulatorowym genu, związanym z miejscami odległymi od promotora, oddziaływać z białkami, które składają się na promotorze. Ogólne czynniki transkrypcyjne, składające się w miejscu promotorowym, są takie same dla wszystkich genów transkrybowanych przez polimerazę RNA II; białka regulatorowe genów oraz położenie rozpoznawanych przez nie miejsc w stosunku do promotorów są natomiast różne dla różnych genów. Szybkość inicjacji transkrypcji jest określana przez połączenie działania różnych białek regulatorowych. Dotąd dla żadnego genu nie wyjaśniono jednak dokładnie, w jaki sposób działania różnych białek regulatorowych są ze sobą powiązane (zmodyfikowane wg B. Alberts).

tywność kinazy białkowej (fosforylującej polimerazę RNA) oraz helikazy. Uczestniczy w elongacji transkrypcji i fosforylacji cyklinozależnych kinaz regulujących cykl komórkowy. W wiązaniu ogólnych czynników transkrypcyjnych do kasety TATA pośredniczy białko TBP, podjednostka ogólnego czynnika transkrypcyjnego TFIID. W wiązanie z mniejszym rowkiem helisy DNA jest zaangażowana konserwatywna w ewolucji C-końcowa domena tego białka. Sposób jej wiązania jest różny od wykazywanego przez czynniki transkrypcyjne wiążące się z większym rowkiem DNA w obrębie swoistych sekwencji w promotorach i wzmacniaczach.

Swoiste czynniki transkrypcyjne (aktywatory i represory transkrypcji), obecne jedynie w niektórych komórkach, są odpowiedzialne za zróżnicowaną ekspresję genów w rozwoju, różnicowaniu i odpowiedzi komórek na bodźce środowiskowe. Swoiste czynniki transkrypcyjne wiążą się z określonymi odcinkami DNA w obrębie promotorów bądź sekwencji wzmacniających i oddziałują na podstawowy kompleks transkrypcyjny zakotwiczony wokół kasety TATA.

Swoiste czynniki transkrypcyjne zawierają dwie charakterystyczne domeny białkowe – **domenę wiążącą** DNA oraz **domenę aktywującą**, zaangażowaną w wiązanie polimerazy DNA lub innych czynników transkrypcyjnych. Najczęstszymi domenami wiążącymi DNA są: domena heliks–zwrot–heliks (przykładem są białka z domeną homeotyczną, zaangażowane w regulację rozwoju u *Drosophila* oraz białka OCT1 u ssaków), domena zawierająca palce cynkowe z charakterystycznym konserwatywnym układem histydyn i cystein wokół atomu cynku (np. TFIIIA) oraz domena zamka (suwaka) leucynowego, w której reszty leucyny znajdujące się w obrębie sąsiadujących monomerów czynników transkrypcyjnych wspólnie tworzą strukturę wiążącą DNA (do grupy tej należą czynniki transkrypcyjne z rodziny AP1, kodowane przez protoonkogeny *jun* i *fos*). Inny przykład domeny wiążącej DNA, wymagającej dimeryzacji, to domena helisa–pętla–helisa,

występująca m. in. w białku myoD, odpowiedzialnym za różnicowanie się komórek mięśniowych. Wśród domen aktywujących transkrypcję wyróżnia się domeny bogate w aminokwasy kwaśne, domeny bogate w glutaminę oraz domeny prolinowe. W obrębie czynników transkrypcyjnych wymagających do swej aktywności dimeryzacji można także wyróżnić domeny dimeryzacyjne. Tworzenie dimerów przez różne podjednostki czynników transkrypcyjnych znacząco zwiększa siłę oddziaływania z DNA, różnorodność kompleksów oraz liczbę sekwencji DNA rozpoznawanych przez kompleksy czynników transkrypcyjnych. Domeny aktywujące oddziałują na sposób funkcjonowania podstawowego kompleksu transkrypcyjnego przez interakcję z ogólnymi czynnikami transkrypcyjnymi: TFIID, TFIIB i TFIIH, wpływając na tworzenie, stabilność kompleksu oraz zróżnicowaną fosforylację polimerazy RNA II.

Genotyp a fenotyp – rola swoistych czynników transkrypcyjnych

Wszystkie komórki zarodkowe mają jednakowy zestaw genów pochodzących od zapłodnionej komórki jajowej. W czasie rozwoju ontogenetycznego dochodzi do zróżnicowanej ekspresji genów zawartych w chromosomach komórek. Proces ten decyduje nie tylko o rozwoju osobnika, powstawaniu segmentów ciała, narządów, ale także o różnicowaniu się komórek w obrębie tkanki. Różnicowanie zachodzi nie tylko w okresie embrionalnym, ale w ciągu całego życia organizmu wielokomórkowego. Ostateczny fenotyp poszczególnych komórek organizmu jest różny i zależy od zestawu genów, które uległy ekspresji. Zarówno proces dojrzewania, jak i różnicowania jest jednak zależny od sekwencji genów, które ulegają ekspresji na odpowiednich etapach rozwoju. Również fenotyp komórki odpowiadającej na bodziec środowiskowy jest wypadkową zestawu genów ulegających ekspresji w danym etapie cyklu życia komórki, w sytuacji jej pobudzenia hormonalnego, pobudzenia do wzrostu czy też uszkodzenia. W regulacji powyższych procesów istotną rolę odgrywają czynniki transkrypcyjne, których ekspresja na określonych etapach rozwoju albo pobudzenie warunkuje powstanie określonego fenotypu komórkowego. Przykładami genów kodujących czynniki transkrypcyjne zaangażowane w proces rozwoju embrionalnego są **geny homeotyczne** *Hox*, a także inne geny kierujące procesem segmentacji, np. geny *Pax*. Istnieją również przykłady białek, których właściwa ekspresja kontroluje powstawanie typów komórek oraz całych narządów. MyoD jest czynnikiem transkrypcyjnym aktywnym w komórkach prekursorowych mięśni szkieletowych oraz miotubach, regulującym ekspresję zależnych od genów *MyoD* różnicowania komórek mięśniowych. Należy podkreślić, że białko MyoD aktywuje również ekspresję własnego genu, co ma znaczenie w przekazaniu do komórek potomnych uzyskanego w czasie różnicowania wzorca ekspresji genów. Czynniki transkrypcyjne zostają aktywowane w wyniku pobudzenia licznych szlaków sygnalizacji wewnątrzkomórkowej (zob. rozdz. 9). Przykładem jest pobudzenie fosforylacji białka JUN, składnika czynnika transkrypcyjnego AP1 w wyniku uruchomienia szlaku kinaz RAS--RAF-ERK przez czynniki wzrostu oraz fosforylacja i pobudzenie czynników transkrypcyjnych STAT przez kinazy JAK/TYK asocjowane z receptorami niektórych cytokin, m. in. interferonu γ, interleukiny 6. Innym rodzajem regulacji funkcji czynników transkrypcyjnych może być oddziaływanie z cząsteczkami białkowymi blokującymi dany czynnik (np. regulacja NF-kB) Regulacja aktywności czynników transkrypcyjnych może również następować wskutek wiązania się z przekaźnikami wewnątrzkomórkowymi. Przykładem jest wiązanie hormonów steroidowych do wewnątrzkomórkowych receptorów, po translokacji do jądra, pełniących funkcję czynników transkrypcyjnych. Cytoplazmatyczne receptory dla hormonów tarczycy odgrywają rolę represorów transkrypcji, a po ich związaniu z ligandem transkrypcja genów docelowych zostaje aktywowana. Aktywowane czynniki transkrypcyjne regulują aktywność genów docelowych, co umożliwia komórce zareagowanie na pojawienie się ligandu – hormonu, cytokiny, czynnika wzrostowego – w środowisku zewnątrzkomórkowym.

Regulacja ekspresji przez alternatywne dojrzewanie RNA

Alternatywne, czyli prowadzone w różny sposób, dojrzewanie transkryptu prowadzi do powstania produktów RNA różniących się niekiedy w bardzo znacznym stopniu. Alternatywne dojrzewanie prekursora matrycowego RNA może prowadzić do powstania RNA różniących się występowaniem miejsca poliadenylacji (proces alternatywnego dojrzewania końca poliadenylowego) lub produktów różniących się zestawem eksonów obecnych w dojrzałym RNA (alternatywny *splicing*). Odmienna poliadenylacja może przyczynić się do powstania RNA o zmienionej lokalizacji wewnątrzkomórkowej oraz odmiennej stabilności. Ta sama komórka może prowadzić poliadenylację określonego

RNA w różnych miejscach. Miejsce poliadenylacji może być również swoiste dla określonego typu komórek. Alternatywny *splicing* może prowadzić do powstania dojrzałego RNA złożonego z różnych zestawów eksonów, o odmiennych miejscach poliadenylacji, mającego sekwencję wybranych intronów. Alternatywny *splicing* może prowadzić do powstania produktów RNA o znacząco odmiennych właściwościach biologicznych, np. zmiany wytwarzania immunoglobuliny powierzchniowej w immunoglobulinę rozpuszczalną bądź powstawanie rozpuszczalnych receptorów niektórych cytokin, tj. substancji regulujących przebieg reakcji immunologicznej i zapalnej, np. interleukiny 5 lub 6. Inną, bardzo rzadką w komórkach zwierzęcych modyfikacją RNA, która może ostatecznie wpłynąć na aktywność produktu genu, jest tzw. redagowanie RNA, które jest posttranskrypcyjną zamianą pojedynczych zasad. Mechanizm tego procesu jest niewyjaśniony; w poznanych przypadkach w komórkach ludzkich prowadzi bądź do zamiany aminokwasu, bądź do powstania krótszego polipeptydu.

Kontrola ekspresji genu – regulacja stabilności RNA

Na proces ekspresji genu wpływa również podatność zarówno mRNA, jak i białka na degradację wewnątrz komórki. Procesy te zachodzą głównie w cytoplazmie. W przypadku RNA różnych genów stwierdzono, że bogate w A i U sekwencje tandemowe, występujące w regionie 3' RNA, przyczyniają się do niestabilności transkryptu. Obecność kapu na końcu 5' RNA pełni prawdopodobnie funkcję stabilizującą transkrypt w cytoplazmie. Przynajmniej w niektórych przypadkach, jak dla mRNA β-tubuliny, protoonkogenów *c-myc* i *c-fos*, degradacja mRNA wymaga obecności kodowanego przezeń produktu białkowego.

Zmienność genetyczna

Źródłem różnorodności gatunków zwierząt i roślin obecnych w świecie ożywionym, a także różnorodności obserwowanej wśród osobników tego samego gatunku jest odmienność ich genomów. Zmienność genetyczna, czyli różnice między genomami poszczególnych gatunków, są znacznie silniej zaznaczone w porównaniu z różnicami między genomami osobników tego samego gatunku. Na podstawie genetycznych różnic międzygatunkowych można określić stopień pokrewieństwa określonych gatunków, można również wnioskować o tym, w jaki sposób genomy zmieniały się w procesie ewolucji.

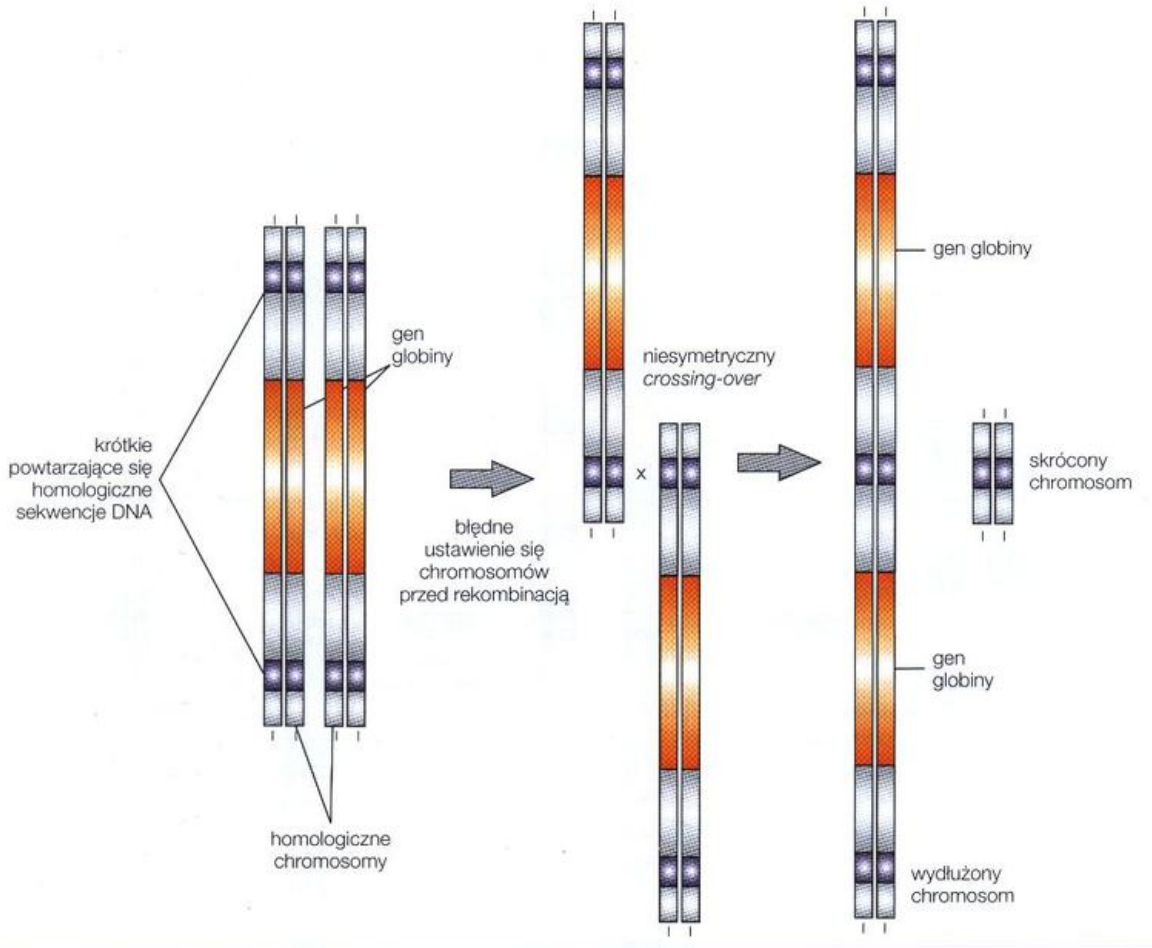
Istnieją dwa podstawowe źródła zmienności genetycznej. Jednym z nich są mutacje, czyli zmiany sekwencji DNA, zmieniające zakodowaną w nim informację o strukturze RNA i białka. Drugim źródłem zmienności genetycznej, ograniczonym do organizmów rozmnażających się płciowo, jest segregacja puli genów podczas powstawania komórek płciowych. Zjawisko segregacji puli genów prowadzi do powstania nowych kombinacji genów o różnej charakterystyce, a w ten sposób generuje niezwykłą różnorodność obserwowaną wśród osobników tego samego gatunku.

Mutacje

Mutacje DNA powstają wskutek błędów procesu replikacji DNA, a także na skutek działania czynników fizycznych i chemicznych oddziałujących na komórki oraz powstających w komórce podczas niektórych procesów komórkowych (np. generacja wolnych rodników uszkadzających DNA). Utrwalone mutacje, które nie zostały skorygowane przez procesy naprawcze DNA, w zależności od lokalizacji i rozległości, mogą wpływać na wykształcenie się zmienionego fenotypu wskutek powstawania odmiennych – polimorficznych wersji genów, alleli. Mutacje mogą być niewielkimi zmianami struktury DNA, np. **mutacje punktowe** są wynikiem zamiany jednej pary zasad na drugą. Innymi niewielkimi mutacjami są **delecje** bądź **insercje** pary zasad. Zazwyczaj insercje i delecje, częściej niż mutacje punktowe, wywołują zmianę fenotypu. To wiąże się przede wszystkim z odmiennym sposobem odczytu kodonów następującym w wyniku delecji bądź insercji nukleotydów. Rozległe mutacje DNA to podwojenia (**duplikacje**) obszarów genomu, ubytki (**delecje**) obszarów genomu, przeniesienie (**translokacje**) części genomu między chromosomami. Rozległe mutacje – **rearanżacje genomowe**, mogą być wynikiem procesów rekombinacji DNA, aktywacji wirusów oraz wynikiem funkcjonowania transpozonów, ruchomych elementów genetycznych.

Znaczenie duplikacji dla powstawania nowych genów

Jednym z podstawowych mechanizmów odpowiedzialnych za powstawanie nowych genów jest przypadkowa duplikacja DNA (ryc. 2.9). Duplikacje najprawdopodobniej są głównym powodem powstawania rodzin genowych kodujących białka homologiczne o podobnej strukturze i funkcji. Klasycznym przykładem rodziny genowej, która powstała przez duplikację genów, jest rodzina ge-

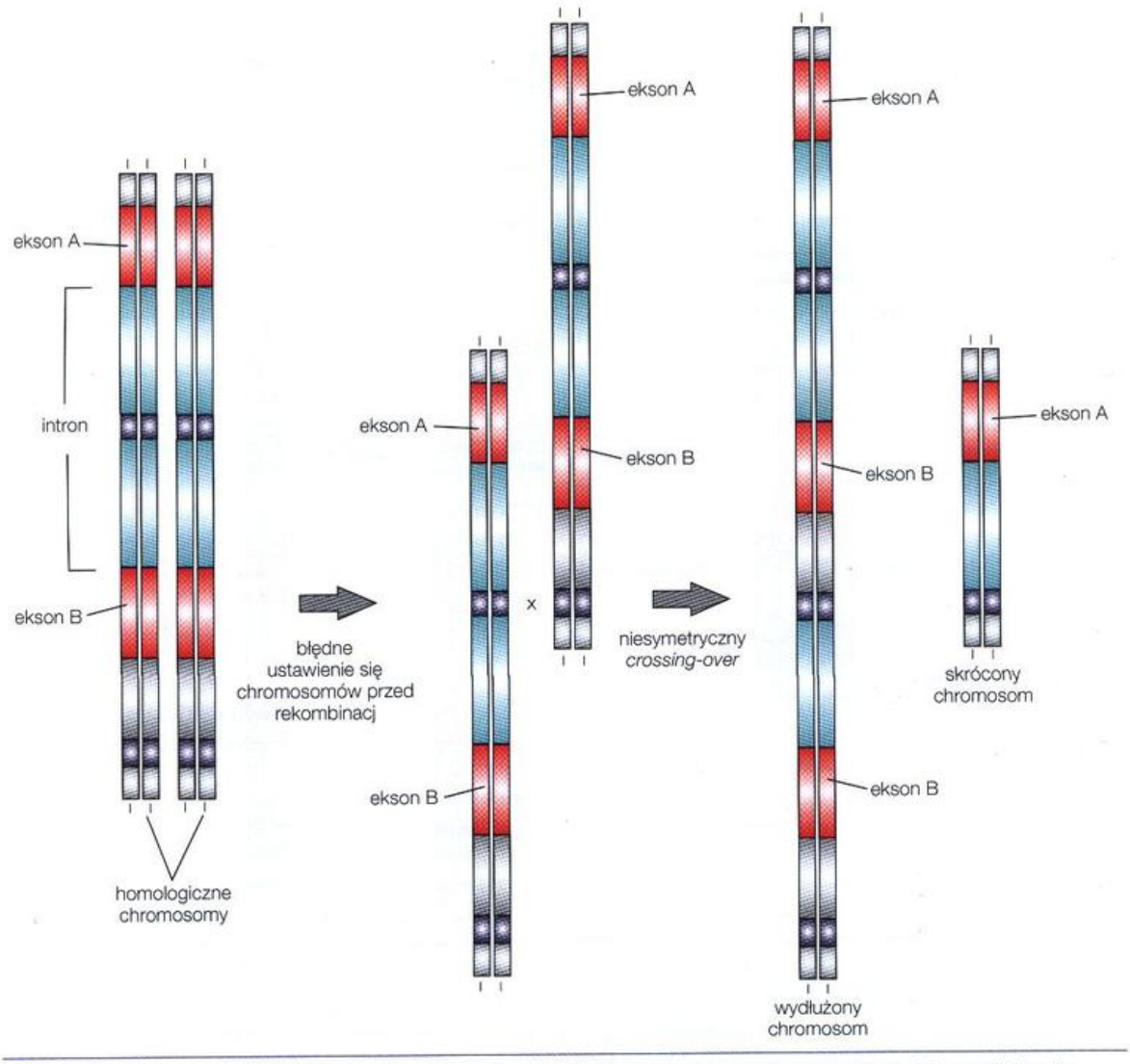


Rycina 2.9 Podwojenie genów przez niesymetryczny *crossing-over*. Para homologicznych chromosomów w prekursorowej komórce linii zarodkowej ulega rekombinacji w miejscu krótkiej sekwencji, powtarzającej się na każdym z chromosomów. W niektórych przypadkach, jak się przypuszcza, sekwencje te są transpozonami, które w genomie człowieka występują w wielokrotnie powtórzonych kopiach. Po rekombinacji jeden z chromosomów zostaje wydłużony i zawiera dwie kopie genu globiny, drugi jest skrócony i zostaje pozbawiony tego genu. Niezależne mutacje w każdym z tych genów, mogące zachodzić w następnych pokoleniach, doprowadziły do ich zróżnicowania (ponieważ skrócony chromosom nie zawiera genu globinowego, osobniki dziedziczące ten chromosom zostały wyeliminowane z populacji) (zmodyfikowane wg B. Alberts).

nów β-globiny. Proces jej powstawania w czasie ewolucji opisano dzięki analizie struktury genów β-globiny u różnych odległych gatunków. Wydaje się, że rodzina tych genów powstała w wyniku powtarzających się rund duplikacji, z których pierwsza wynikała z błędnej rekombinacji i niesymetrycznego procesu wymiany odcinków chromosomów homologicznych (ang. *crossing-over*) w komórce linii płciowej. W wyniku duplikacji dochodzi również niekiedy do powstania **pseudogenów** o budowie zbliżonej do funkcjonalnych genów, ale odznaczających się licznymi sekwencjami kończącymi translację lub hamującymi dojrzewanie RNA. W wyniku akumulacji tych sekwencji pseudogeny nie kodują białka.

Rekombinacja, tasowanie eksonów

Innym mechanizmem prowadzącym do powstawania nowych genów jest rekombinacja eksonów, określana również jako ich **tasowanie** (ang. *shuffling*) (ryc. 2.10). Poszczególne domeny białkowe mogą być kodowane przez odrębne eksony przedzielone sekwencjami intronowymi. Wskutek rekombinacji zachodzącej w następstwie niesymetrycznego *crossing-over* dochodzi do powstawania nowych pokrewnych genów, różniących się od genów macie-



Rycina 2.10 Podwojenie eksonu przez niesymetryczny *crossing-over*. Ogólny schemat jest taki sam jak na ryc. 2.9, z tą różnicą, że podwojony zostaje ekson w obrębie genu, a nie cały gen. Informacyjny RNA wyjściowego genu zawiera dwa eksony A i B, a mRNA transkrybowany z chromosomu wydłużonego zawiera trzy eksony (A, B oraz B). Ponieważ podwojone eksony są połączone przez intron z nienaruszoną sekwencją *splicingową*, transkrypt zmodyfikowanego genu może podlegać poprawnemu *splicingowi*, dając funkcjonalny mRNA (zmodyfikowane wg B. Alberts).

rzystych obecnością dodatkowych, zduplikowanych domen białkowych. W podobny sposób następuje wprowadzanie nowych domen do białek o zupełnie odmiennej funkcji i tworzenie białek hybrydowych. Proces tasowania eksonów i powstawania nowych białek bądź białek wykazujących nowe właściwości jest w znaczący sposób ułatwiony dzięki rekombinacji zachodzącej w obrębie intronów. W ten sposób szansa, że wskutek rekombinacji powstanie nowe, funkcjonalne białko, jest znacznie zwiększona. Proces rekombinacji segmentów genowych ma znaczenie nie tylko dla ewolucji, ale również w życiu każdego osobnika ludzkiego. Proces ten warunkuje bowiem powstanie zmienności przeciwciał oraz obecnych na limfocytach T receptorów dla antygenów (receptory TCR).

Do zmienności genetycznej przyczynia się również obecność **transpozonów**, ruchomych odcinków DNA przemieszczających się między chromosomami. Istnienie sekwencji transpozonowych może

ułatwiać rekombinację homologiczną i prowadzić do duplikacji genów. Transpozony przyczyniają się również do tasowania eksonów oraz mutacji zachodzących wskutek insercji transpozonów do genu w obrębie sekwencji zarówno strukturalnych, jak i regulacyjnych.

Znaczenie rozmnażania płciowego dla zmienności genetycznej – segregacja genów w komórkach haploidalnych

W wyniku rozmnażania płciowego dochodzi do wymieszania się genomów dwóch osobników rodzicielskich. Pojawienie się nowej kombinacji cech w osobniku potomnym najprawdopodobniej zwiększa prawdopodobieństwo korzystnego dostosowania się do warunków środowiskowych. W mejozie, w czasie powstania rozrodczych komórek haploidalnych (gamet), mających tylko jeden zestaw chromosomów, dochodzi do losowego rozmieszczenia chromosomów pochodzących od ojca i matki. Ponieważ chromosomy te mogą mieć odmienne allele genów, dochodzi do powstania wielu różnych komórek rozrodczych zawierających odmienne kombinacje genów. W wyniku zapłodnienia komórki jajowej przez plemnik powstaje komórka diploidalna, zygota, mająca dwa zestawy chromosomów o nowej kombinacji genów charakterystycznej dla tej komórki.

Rekombinacja materiału genetycznego podczas mejozy

Podczas mejozy dochodzi do koniugacji zreplikowanych chromosomów matczynego i ojcowskiego. Ponieważ skoniugowane chromosomy zawierają sekwencje DNA w ogromnym stopniu homologiczne, w mejozie następuje rekombinacja homologiczna i wymiana odcinków między chromosomami pochodzącymi od ojca i matki danego osobnika. Dochodzi także do jednej bądź dwóch wymian odcinków homologicznych między każdą parą chromosomów. Zjawisko to określane jest jako *crossing-over* i jest bardzo istotną przyczyną zmienności genetycznej przejawianej przez osobniki określonego gatunku.

Analiza i modyfikacja materiału genetycznego, inżynieria genetyczna

Postęp w poznaniu struktury i funkcji kwasów nukleinowych oraz mechanizmów enzymatycznych sterujących ekspresją genów w komórkach zarówno eukariotycznych, jak i prokariotycznych pozwolił na opracowanie i rozpowszechnienie metod umożliwiających izolację DNA, manipulację określonych odcinków DNA, ich syntezę w warunkach *in vitro* oraz wprowadzanie z powrotem do żywych komórek. Techniki te określane są zbiorczo jako techniki inżynierii genetycznej lub rekombinacyjnej technologii DNA. Ich burzliwy rozwój obserwowany od połowy lat siedemdziesiątych XX w. umożliwił nie tylko powstanie nowej gałęzi przemysłu – nowoczesnej, molekularnej biotechnologii, ale przyczynił się również do osiągnięcia ogromnego postępu w naukach biologicznych i medycznych. Wydaje się, że kluczowymi osiągnięciami technologii rekombinowanego DNA były przede wszystkim: izolacja i charakteryzacja enzymów modyfikujących DNA, izolacja plazmidów bakteryjnych zdolnych do autonomicznej replikacji i ich zastosowanie jako nośników obcego DNA – czyli **wektorów** do klonowania DNA, możliwość chemicznej syntezy oligonukleotydów, opracowanie sond genetycznych i technik wykrywania DNA opartych na zasadzie hybrydyzacji kwasów nukleinowych, rozwój techniki sekwencjonowania DNA oraz techniki powielania DNA metodą łańcuchowej reakcji polimerazy (ang. PCR, *polymerase chain reaction*).

Izolacja kwasów nukleinowych

Techniki izolacji kwasów nukleinowych są nie tylko niezbędne do uzyskania przedmiotu manipulacji, jakim jest DNA lub RNA, ale konieczne są również na różnych etapach pracy z namnażanym, klonowanym DNA. Od niedawna techniki izolacji zostały wsparte przez możliwość uzyskiwania dużej liczby określonych odcinków DNA dzięki reakcji PCR (zob. rozdz. 14), wykorzystującej termostabilną polimerazę do powielania DNA.

Enzymatyczna modyfikacja kwasów nukleinowych

Techniki inżynierii genetycznej wykorzystują powszechnie enzymy modyfikujące kwasy nukleinowe. Należą do nich: endonukleazy restrykcyjne (zdolne do rozcinania DNA w miejscu określonej sekwencji na fragmenty), polimerazy DNA i RNA, egzo- i endonukleazy, ligazy, fosfatazy i kinazy. Znajomość właściwości poszczególnych enzymów umożliwia uzyskanie produktu rekombinacji DNA o określonej charakterystyce, np. znajomość sekwencji rozpoznawanych przez enzymy restrykcyjne pozwala na odpowiednie zaprojektowanie wolnych końców trawionego DNA, co po połączeniu (ligacji) z określonym odcinkiem DNA, posiadającym np. miejsca rozpoznawane przez te same enzymy restrykcyjne, umożliwia uzyskanie produktu o znanej sekwencji w miejscach połączenia fragmentów DNA.

Klonowanie DNA, wektory

Techniki klonowania, czyli namnażania DNA i RNA, wymagają wykorzystania nośników obcego DNA – wektorów, zdolnych do autonomicznego namnażania się w komórce. Wektory są konstruowane m. in. na podstawie bakteryjnych plazmidów, genomu bakteriofagów lub chromosomów drożdżowych. Istotną cechą wektora jest posiadanie markera selekcyjnego, np. genu kodującego oporność na antybiotyk, co umożliwia identyfikację i izolację rekombinantów bakteryjnych, mających określony wektor i przeżywających w określonym środowisku selekcyjnym. Proces wprowadzania obcego DNA do wektorów jest znacząco ułatwiony przez obecność tzw. miejsc wielokrotnego klonowania (ang. *multiple cloning sites*), tj. odcinków rozpoznawanych przez liczne enzymy restrykcyjne, co umożliwia wygodne wprowadzanie wstawek, insertów DNA za pomocą odpowiednich zestawów enzymów restrykcyjnych.

Analiza DNA

Następne etapy klonowania oraz modyfikowania genów wymagają przeprowadzenia analizy prawidłowości dokonanych manipulacji DNA. Analiza DNA opiera się m. in. na technikach hybrydyzacji, które wykorzystują zasadę komplementarności zasad azotowych występujących w kwasach nukleinowych. Do stwierdzenia obecności określonego odcinka DNA konieczne jest posiadanie bądź zsyntetyzowanie sondy (ang. *probe*) DNA lub RNA komplementarnej do poszukiwanego odcinka. Zastosowanie znakowanej izotopem bądź chemicznie sondy umożliwia wizualizację reakcji hybrydyzacji. Inną techniką analizy DNA wykorzystywaną obecnie powszechnie w wielu procesach analizy DNA jest sekwencjonowanie DNA. W ostatnich latach upowszechniło się automatyczne sekwencjonowanie DNA, wykorzystujące enzymatyczne metody sekwencjonowania i wbudowanie znakowanych fluorochromami pochodnych nukleotydów, które są wykorzystywane w reakcji polimeryzacji DNA. Zastosowanie odpowiednich laserów i oprogramowania komputerowego umożliwia uzyskiwanie dokładnej i szybkiej informacji o badanych sekwencjach. Techniki automatycznego sekwencjonowania stały się kluczem do sukcesu Projektu Poznania Ludzkiego Genomu (HUGO – *Human Genome Organization*).

Biblioteki DNA

Biblioteki DNA są zbiorami fragmentów genomowego DNA (biblioteki genomowego DNA, uzyskanego z chromosomowego DNA) lub DNA komplementarnego do RNA, cDNA (biblioteki cDNA, *complementary* DNA, DNA uzyskanego po przepisaniu mRNA w DNA za pomocą odwrotnej transkryptazy). Każdy z fragmentów DNA jest wbudowany do osobnej cząsteczki wektora. Wektorami używanymi do konstrukcji bibliotek są m. in. plazmidy, bakteriofagi, chromosomy drożdżowe. Biblioteki DNA są wykorzystywane do izolacji genów. Wyszukiwanie określonego klonu biblioteki, mającego pożądany odcinek DNA, odbywa się głównie z wykorzystaniem metod hybrydyzacji za pomocą komplementarnych sond DNA lub z zastosowaniem swoistych przeciwciał bądź innych białek wiążących się z poszukiwaną strukturą białkową (dotyczy to tzw. bibliotek ekspresyjnych, w których dochodzi do ekspresji sekwencji białkowych w komórkach mających wektory).

Ekspresja białek

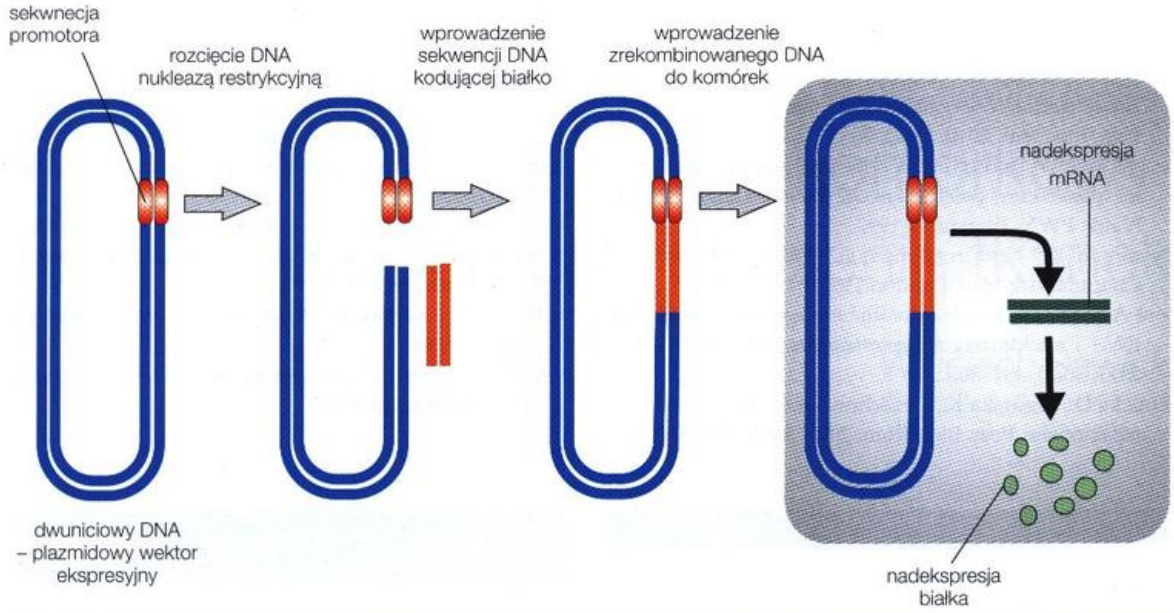
Inżynieria genetyczna umożliwiła produkcję dużych ilości białek występujących w bardzo niewielkich ilościach w komórkach eukariotycznych. Poznanie struktury i funkcji rzadkich białek byłoby niemożliwe z zastosowaniem klasycznych biochemicznych metod izolacji i oczyszczania. Ekspresję takich białek (ryc. 2.11) uzyskuje się w komórkach bakterii, drożdży, owadów lub ssaków dzięki zastosowaniu wektorów ekspresyjnych, mających klonowany gen. Wektory ekspresyjne mają odpowiednie do komórki sekwencje promotorowe i regulacyjne, które umożliwiają efektywną syntezę mRNA i białka pochodzącego nawet z odległych ewolucyjnie organizmów.

KLINIKA

Obecnie wiele z leków białkowych wytwarza się technikami inżynierii genetycznej, m. in.: insulinę, czynnik VIII, interferony. W wyniku zastosowania techniki ukierunkowanej oraz przypadkowej mutagenezy jest możliwa dalsza manipulacja klonowanego DNA, co pozwala m. in. na zidentyfikowanie regionów białka odpowiedzialnych za jego określone funkcje biologiczne lub zmianę cech danego produktu białkowego, np. zwiększenie jego stabilności.

Genetyczna modyfikacja organizmów zwierzęcych (organizmy transgeniczne)

Obecnie najbardziej spektakularnym zastosowaniem technik rekombinacyjnych DNA jest konstruowanie genetycznie zmodyfikowanych organizmów zwierzęcych. Wprowadzone modyfikacje



Rycina 2.11 Wytwarzanie dużych ilości białka przez klonowanie sekwencji DNA kodującej to białko w wektorze ekspresyjnym wprowadzonym do komórek. Skonstruowano plazmidowy wektor, który zawiera bardzo aktywny promotor, powodujący intensywną transkrypcję przyległego odcinka DNA, kodującego białko. Sekwencję taką wprowadza się do plazmidowego wektora ekspresyjnego. Zależnie od charakteru wektora, zrekombinowany plazmid jest wprowadzany do komórek bakterii, drożdży, owadów lub ssaków, w których zawarty w plazmidzie gen ulega efektywnie transkrypcji, a następnie translacji do białka (zmodyfikowane wg B. Alberts).

mogą polegać na dodaniu genu, zastąpieniu genu jego zmutowaną formą lub usunięciu (znokautowaniu) genu. W przypadku dodania genu może on być połączony ze swoistym tkankowo promotorem, co dodatkowo umożliwia ocenę funkcjonowania nadmiaru genu w określonej tkance. Transgeniczne zwierzęta mogą być otrzymywane przez bezpośrednie wprowadzenie genu do zapłodnionej komórki jajowej lub do wczesnego zarodka, a także przez wprowadzenie jądra komórki zmodyfikowanej genetycznie do komórki jajowej pozbawionej własnego jądra (klonowanie). Modyfikacje prowadzące do zastąpienia lub usunięcia genu wymagają zastosowania innej metody uzyskiwania zwierząt transgenicznych wykorzystującej komórki zarodkowe macierzyste (ang. ES, *embryonic stem cells*), zdolne do odtworzenia komórek linii płciowej. Po wprowadzeniu do komórek ES odpowiedniego konstruktu genowego, umożliwiającego homologiczną rekombinację z genem obecnym na przynajmniej jednym chromosomie, następuje etap selekcji kolonii komórkowych, w których wprowadzony konstrukt genowy zastąpił normalny gen. Tak zmodyfikowane komórki ES są wprowadzane do blastocysty, a następnie blastocysta jest implantowana do macicy hormonalnie przygotowanej samicy myszy, wśród której potomstwa są selekcjonowane osobniki z wymienionym bądź usuniętym, czyli znokautowanym genem.

KLINIKA

Zwierzęta genetycznie zmodyfikowane, a przede wszystkim genetycznie modyfikowane myszy stały się w ostatnich latach niezwykle przydatnym modelem do badań nad funkcją różnych genów, a także służą do wyjaśnienia wielu chorób człowieka.

Piśmiennictwo

Alberts B., Bray D., Hopkin K.: *Podstawy biologii komórki. Część 1*. Wyd. Nauk. PWN, Warszawa 2007.

Alberts B., Bray D., Hopkin K., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walker P.: *Podstawy biologii komórki. Część 2*. Wyd. Nauk. PWN, Warszawa 2009.

Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walker P.: *Molecular biology of the cell*. Garland Science, 2007.

Alster A., Korwek Z.: *Znaczniki starzenia komórkowego*. Post. Biochem. 2014, 60(2), 138–146.

Collins F.S., Jegalian K.G.: *Odczytać kod życia.* Świat Nauki 2000, 1(101), 52–58.

Guz J., Foksiński M., Oliński R.: *Mechanizm metylacji i demetylacji DNA – znaczenie w kontroli ekspresji genów.* Post. Biochem. 2010, 56(1), 7–15.

Krzyżosiak W. (red.): *Genom człowieka. Największe wyzwanie współczesnej genetyki i medycyny molekularnej.* Wyd. Nauk. PWN, Warszawa 1997.

Latchman D.: *Gene regulation. A eukaryotic perspective.* Chapmann & Hall, London 1997.

Mol A., Stolarek M.: *Indukowane mutagenami uszkodzenia DNA i mechanizmy ich powstawania.* Post. Biol. Kom. 2011, 38(3), 491–505.

Sitnicka D., Figurska K., Orzechowski S.: *Analiza funkcjonalna genów.* Post. Biol. Kom. 2009, 36(4), 503–516.

Stępniewski J., Józkowicz A., Dulak J.: *Rola mikroRNA w reprogramowaniu komórek.* Post. Biochem. 2013, 59(2), 157–163.

Szcześniak M., Szweykowska-Kulińska Z.: *Regulacja alternatywnego splicingu.* Post. Biol. Kom. 2009, 36 (1), 23–35.

Tsien J.Y.: *Przepis na sprytne myszy.* Świat Nauki 2000, 7(107), 42–50.

Turner P.C., McLennan A.G., Bates A.D., White M.R.H.: *Biologia molekularna. Krótkie wykłady.* Wyd. Nauk. PWN, Warszawa 2013.

Walker M.R., Rapley R.: *Route map in gene technology.* Wiley J 2009.

Węgleński P. (red.): *Genetyka molekularna.* Wyd. Nauk. PWN, Warszawa 2012.

ROZDZIAŁ 3

Cykl komórkowy, proliferacja i starzenie tkanek

Wojciech Sawicki

HASŁA

Proliferacja, hipertrofia i akrecja

Proliferacja (rozrost, hiperplazja) jest pomnażaniem liczby komórek przechodzących przez cykl komórkowy. Hipertrofia (przerost) jest zwiększeniem masy pojedynczych komórek wskutek zwiększenia liczby makrocząsteczek. Akrecja jest zwiększeniem masy istoty międzykomórkowej. Losy komórek opuszczających cykl mogą być następujące:

- komórki wchodzą w następny cykl komórkowy,
- opuszczają cykl, wchodząc w stan spoczynkowy G0,
- pod wpływem cytokin, hormonów i in. czynników komórki mogą wchodzić ponownie do cyklu,
- komórki po przeprogramowaniu swojego epigenomu różnicują się (specjalizują), tracąc zdolność dzielenia się,
- wchodzą na drogę starzenia się,
- włączają program śmierci samobójczej i giną.

Cykl komórkowy (cykl mitotyczny, cykl podziałowy)

Jest to szereg kolejno zachodzących zmian chemicznych, fizycznych i strukturalnych komórek. Zmiany te prowadzą do podwojenia materiału genetycznego i epigenetycznego, a następnie do ich precyzyjnego rozdzielenia między potomne komórki. Składa się z **interfazy**, czyli fazy G1 + S + G2, oraz **mitozy**, czyli fazy M. Odpowiada za pomnażanie liczby komórek, czyli proliferację komórkową.

Faza G1

Jest okresem między końcem mitozy i początkiem syntezy DNA, kiedy komórka podejmuje decyzję, czy pozostać w cyklu, przekraczając **punkt restrykcyjny (R)**, czy też wyjść z cyklu do stanu spoczynkowego G0, czy popełnić samobójstwo, czy zróżnicować się lub wejść na drogę starzenia. Przekroczenie punktu R wymaga nagromadzenia substratów i syntezy białek, a szczególnie cykliny D, która działa jak czujnik substancji mitogennych. Cyklina łączy się następnie z kinazą CDK4/6, fosforylując i unieczynniając białko RB. To aktywuje czynnik transkrypcji E2F i transkrypcję cykliny E oraz polimerazy DNA. Kompleks cyklina E/CDK2 powoduje przejście G1 → S. Punkt R nazywany jest także **punktem kontrolnym G1**, monitorującym nieprawidłowości struktury DNA. Takie nieprawidłowości zatrzymują cykl w fazie G1 aż do ich reperacji.

Faza S: podwojenie genomu (DNA) i epigenomu (hemimetylacja cytozyny DNA i odtworzenie kodu histonowego)

Synteza DNA jest typu semikonserwatywnego i trwa 6–8 godz. Specjalny zestaw białek zapobiega ponownej syntezie DNA w tej samej fazie S. Synteza mitochondrialnego DNA, podobnie jak synteza uszkodzonych fragmentów DNA, może zachodzić w całej interfazie. W fazie S poza syntezą DNA następuje powielenie i odtworzenie epigenomu, tj. hemimetylacja cytozyny nowych nici DNA, oraz rekonstruowany jest kod histonowy sprzed syntezy DNA. We wczesnej fazie S syntetyzowany

jest genom i epigenom euchromatyny zawierającej czynne geny, a w późnej fazie S – genom i epigenom heterochromatyny zawierającej nieaktywne geny. Gdy DNA komórki jest uszkodzony, faza S jest hamowana przez białko p53 (**punkt kontrolny fazy S**) do czasu jego reperacji.

Faza G2

Jest okresem życia komórki między końcem fazy S i początkiem mitozy. W tej fazie narasta stężenie cykliny B1, która łączy się z kinazą CDK1 i fosforyluje histon 1, laminy jądrowe, białka centrosomu i MAP, co prowadzi do przejścia G2 → M. Uszkodzenia DNA oraz zbyt małe komórki są tutaj monitorowane (**punkt kontrolny G2**) z pomocą kinazy Chk, białka p53 oraz innych kinaz, a przejście G2 → M jest hamowane do czasu reperacji DNA lub powiększenia komórek.

Mitoza (faza M)

Składa się z podziału jądra, czyli **kariokinezy,** i podziału cytoplazmy, czyli **cytokinezy.** W kariokinezie wyróżnia się profazę, prometafazę, metafazę, anafazę i telofazę. W czasie kariokinezy zanika struktura jądra, a chromatyna kondensuje, wytwarzając chromosomy mitotyczne, z których każdy dzieli się na dwie chromatydy siostrzane odprowadzane do biegunów komórki w anafazie. Zjawiskom tym towarzyszy wytworzenie, a potem rozpad wrzeciona podziałowego, fragmentacja, a następnie odbudowa otoczki jądrowej oraz rozpad, a potem rekonstrukcja jąderka.

Wrzeciono podziałowe

Jest strukturą składającą się z mikrotubuli kinetochorowych, ramiennych, biegunowych i astralnych oraz z białek towarzyszących mikrotubulom. W organizowaniu wrzeciona biorą udział centrosomy wraz z centriolami oraz specjalne białka końców mikrotubuli i cytoplazmy. Dzięki wrzecionu chromosomy są sytuowane w płaszczyźnie równikowej komórki, a następnie odprowadzane ku centrosomom. Wrzeciono podziałowe jest również odpowiedzialne za usytuowanie płaszczyzny cytokinezy, wielkość komórek potomnych oraz ich różnicowanie. Nieprawidłowości wrzeciona podziałowego oraz przechodzenia komórki przez mitozę powodują jej zahamowanie w tej fazie (**punkt kontrolny wrzeciona podziałowego**), co zapobiega aneuploidii.

Wewnętrzna regulacja cyklu komórkowego

Cykl komórkowy jest napędzany i regulowany złożoną maszynerią białkową. Poszczególne fazy cyklu komórkowego są włączane w stałej kolejności i dopóki nie skończy się pomyślnie jedna faza, nie rozpoczyna się następna. Geny cyklu komórkowego, które kodują białka pobudzające cykl, nazywane są **protoonkogenami**, a te które kodują białka hamujące cykl – **genami supresorowymi**. Kluczową rolę w napędzaniu cyklu komórkowego odgrywają **kinazy zależne od cyklin – CDK,** aktywowane przez cykliny i fosforylację/defosforylację. Stężenie CDK w komórce jest stałe, a stężenie cyklin zmienia się w różnych fazach cyklu, aktywując różne CDK. Powoduje to przeprowadzenie komórki przez określoną fazę cyklu, jej zakończenie i rozpoczęcie następnej. Obok białek napędzających cykl, istnieją również **inhibitory cyklu (CKI)**, które hamują cykl. Należą do nich białko RB i p53 oraz białka – produkty genów *INK4 i CIP/KIP*.

Regulacja cyklu komórkowego z zewnątrz

Na komórki może działać wiele cząsteczek sygnałowych – cytokin (w tym czynników wzrostu i różnicowania), hormonów lub cząsteczek istoty międzykomórkowej. Wiążą się one z receptorami, które włączają/wyłączają cykl komórkowy. Sygnał przekazywany jest przez błonę komórki, a następnie poprzez wiele krzyżujących się między sobą szeregów białek cytoplazmatycznych i informatorów wewnątrzkomórkowych do jądra. Dzięki krzyżowaniu się szlaków transdukcji ten sam sygnał może wywoływać włączenie lub wyłączenie cyklu, albo też włączenie samobójczej śmierci komórki.

Choroby proliferacyjne

Należą do nich choroby nowotworowe i sercowo-naczyniowe. Komórki nowotworowe mają łatwość przekraczania punktów kontrolnych fazy G1, S, G2 i M, ponieważ ich protoonkogeny przekształcają się w onkogeny na skutek mutacji lub translokacji chromosomowej. Łatwość przekraczania punktów kontrolnych może być także skutkiem zablokowa-

nia genów supresorowych. Miażdżyca naczyń ma swoją przyczynę w nadmiernej proliferacji miocytów gładkich. Urazy śródbłonka prowadzą do powstawania przyściennych agregatów płytek krwi wydzielających cytokiny PDGF i in. Cytokiny pobudzają proliferację miocytów gładkich i powstawanie guzków w błonie wewnętrznej naczyń, które następnie degenerują się i wapnieją, powodując powstawanie pierwotnych płytek miażdżycowych.

Definicje starzenia

Ze statystycznego punktu widzenia starzenie jest zwiększeniem prawdopodobieństwa śmierci w miarę upływu czasu życia komórki czy organizmu. Z ewolucyjnego punktu widzenia starzenie jest zjawiskiem paradoksalnym, sprzecznym z prawem doboru naturalnego. Biologiczna definicja starzenia zawiera wiele elementów – przyczyn prowadzących do starzenia:

- istnienie genetycznego programu starzenia, niestabilności genomu i roli telomerów,
- uszkodzenia makrocząsteczek proteomu, genomu, epigenomu i lipidomu, przekładające się na zmiany struktury i funkcji tkanek.

Te elementy – przyczyny starzenia – spina razem **teoria zapalenia starczego.**

Genom i starzenie

Inaktywacja pojedynczych genów komórek drożdży, robaków, muszki owocowej, myszy i ludzi prowadzi albo do wydłużenia życia i hamowania starzenia (np. gen daf2), albo do przyspieszenia starzenia i skrócenia życia (np. geny klotho, *BRCA1, HELQ, GH, IGF1*). Układ immunologiczny jest zaprogramowany genetycznie tak, że maksimum jego rozwoju przypada przed pokwitaniem, z późniejszą inwolucją. Nasila to z wiekiem pojawianie się stanu zapalnego i obniża odporność organizmu.

Mutacje a starzenie

Mutacje DNA są skutkiem błędów dzielących się komórek lub działania toksyn, promieniowania jonizującego, UV i wolnych rodników. Średnio w ludzkim organizmie dzieli się 10 komórek/s, a w $^1/_3$ spośród nich powstają mutacje DNA. Większość mutacji jest naprawiana albo niszczona poprzez śmierć całej komórki. Pozostałe kumulują się, szczególnie w komórkach rzadko się dzielących, upośledzają funkcje komórek, prowadząc do starzenia entropowego i chorób towarzyszących starzeniu – degeneracyjnych i nowotworowych. Szczególne znaczenie mają somatyczne mutacje mitochondrialnego DNA (mitDNA).

Udział telomerów w starzeniu. Starzenie replikacyjne

Większość komórek organizmu dorosłego nie ma telomerazy, wobec czego telomery skracają się po każdym podziale. Całkowity zanik telomeru prowadzi do zahamowania cyklu komórkowego, co w ludzkich embrionalnych komórkach hodowanych *in vitro* następuje po ok. 50 podwojeniach populacji. Zahamowanie podziałów wskutek zaniku telomerów nazywa się **starzeniem replikacyjnym.** W zaawansowanym wieku brak telomerazy w większości komórek organizmu prowadzi do zaniku i uszkodzeń telomerów, czego konsekwencją jest zahamowanie cyklu komórkowego i biogenezy mitochondriów, osłabienie ich funkcji, narastanie stężenia wolnych rodników i spadek glukoneogenezy. Prowadzi to do degeneracji komórek i postępującego starzenia.

Epigenom i starzenie

Starzeniu towarzyszą głębokie zmiany epigenomu składającego się z:

- kilkudziesięciu milionów par cytozyna/guanina (CG) DNA, w których cytozyna może być metylowana,
- z zagęszczeń CG DNA nazywanych **wyspami CG,**
- **kodu histonowego,**
- **mikroRNA.**

Pomiędzy urodzeniem a wiekiem starczym ogólna ilość cytozyny par CG ulega stopniowej hipometylacji, ale u ludzi starzejących się cytozyna wysp CG jest hipermetylowana. Ponieważ większość CG wysp znajduje się w obrębie promotorów ważnych genów, ich hipermetylacja prowadzi do wyciszenia tych genów. Powoduje to hamowanie produkcji białka p53, białek rodziny *INH4* (hamują cykl komórkowy), białek koaktywatorów transkrypcji, PCG (reguluje biogenezę mitochondriów, wytwarzanie ATP i metabolizm), dysmutazy nadtlenkowej (jeden z antyoksydantów), syntazy NO, lipooksygenazy i wielu innych. Jest to powodem zmian

strukturalnych i pogorszenia funkcji komórek oraz zwiększenia ich śmiertelności, czyli starzenia entropowego, któremu towarzyszą choroby wieku starczego – degeneracyjne i nowotwory.

Wolne rodniki i glikacja: uszkodzenie makrocząsteczek

Uszkodzenia makrocząsteczek przez wolne rodniki i glikację prowadzą do powstawania i narastania zmian starczych w komórkach i istocie międzykomórkowej. Ubocznym produktem utleniania są wolne rodniki, których stężenie w tkankach wzrasta z wiekiem wskutek ich nadmiernej produkcji i niewydolności antyoksydantów. Prowadzi to do uszkodzeń genomu, epigenomu, proteomu i lipidomu. Szczególne znaczenie w narastaniu zmian starczych mają mutacje i uszkodzenia DNA, karbonylacja białek oraz peroksydacja lipidów. Z wiekiem w organizmie postępuje także glikacja, a niesprawne, glikacjowane makrocząsteczki wywołują zmiany strukturalne i funkcjonalne komórek, przejawiające się postępującym starzeniem i chorobami mu towarzyszącymi.

Ograniczenie kaloryczne. Peroksyredoksyna 1

Ograniczenie kaloryczne, bez stwarzania warunków niedożywienia, powstrzymuje starzenie i przedłuża życie. Jest poprzedzane: obniżeniem stężenia glukozy, insuliny i trijodotyroniny we krwi, zwiększeniem czułości komórek na insulinę, obniżeniem temperatury, polepszeniem reperacji DNA, zwiększeniem częstości apoptoz oraz opóźnieniem zmian starczych w układzie nerwowym i wewnątrzwydzielniczym. Zmniejsza wytwarzanie wolnych rodników i wydłuża życie ssaków laboratoryjnych o 20%. Enzymami odpowiedzialnymi za dobrotliwe efekty ograniczenia kalorycznego są antyoksydanty – **peroksyredoksyna 1** oraz **sulfiredoksyna 1** reaktywująca zużytą peroksyredoksynę. Dobrotliwe skutki ograniczenia kalorycznego wywołuje modyfikacja epigenomu poprzez ograniczenie dostępności metioniny – donoru grup metylowych dla metylacji cytozyny DNA, lub poprzez aktywację sirtuiny 1 i 5.

Zapalenie starcze

Jest ukształtowanym ewolucyjnie przewlekłym zapaleniem, o słabym nasileniu, występującym u ludzi starzejących się. Charakteryzuje je przestrojenie odporności wrodzonej i nabytej oraz przewaga procesów uszkadzających nad reperacyjnymi. Kluczową rolę w zapaleniu starczym odgrywa czynnik transkrypcji **NFkB** i jego szlaki transdukcji sygnałów oraz kinaza **mTOR** aktywowana przez cytokiny prozapalne. NFkB jest aktywowany przez białka inflammasomu, cytokiny prozapalne, polisacharydy bakteryjne (LPS), uszkodzenia DNA oraz wolne rodniki i końcowe produkty glikacji (AGE). Efektem aktywacji NFkB jest aktywacja i transkrypcja prozapalnych cytokin, chemokin, cząsteczek adhezyjnych, cyklooksyganaz (COX), eikosanoidów, metaloproteaz, synatazy NO i innych, które należą do mechanizmów włączających zapalenie. Aktywowany NFkB reguluje proliferację/różnicowanie komórkowe i apoptozę oraz potęguje reakcje immunologiczne, prowadząc do zmian strukturalnych i upośledzenia funkcji, a w konsekwencji do starzenia entropowego oraz – w przypadkach szczególnie zaawansowanego starzenia – do chorób towarzyszących starzeniu: nowotworów, chorób sercowo-naczyniowych, przewlekłych chorób zapalnych, chorób neurologicznych, chorób metabolicznych, zapalenia stawów i kości, dystrofii mięśniowej, zespołu przewlekłego zmęczenia oraz zmian skórnych.

Cykl komórkowy, proliferacja, hipertrofia, akrecja

Organizm człowieka składa się z ponad 100 bilionów komórek, które powstają w wyniku podziałów z jednej komórki – zapłodnionej komórki jajowej. W ciągu całego życia człowieka liczba cykli komórkowych wynosi 10^{16}, a średnio w ludzkim organizmie co sekundę dzieli się 10 komórek.

Zwiększenie liczby komórek przez ich podziały nosi nazwę **proliferacji, rozrostu** lub **hiperplazji** (*hyperplasia, ang. cell proliferation*). Nowo powstałe w wyniku podziału komórki są mniejsze niż komórka matka, ale w miarę przechodzenia przez cykl komórkowy syntetyzują i magazynują wiele makrocząsteczek, co zwiększa masę i wielkość pojedynczych komórek. Nosi to nazwę **przerostu** lub **hipertrofii** (*hypertrophia*, ang. *hypertrophy*). Po podziale masa i wielkość komórek znów się zmniejszają. Niekiedy komórki znajdujące się poza cyklem, np. komórki tkanki mięśniowej, syntetyzują i odkładają wiele makrocząsteczek, co powoduje ich przerost oraz hipertrofię całych narządów, np. mięśni szkieletowych lub serca.

Wreszcie komórki wytwarzają istotę międzykomórkową, której przyrost nosi nazwę **akrecji** (*accretio*, ang. *accretion*). Zjawisko to, obok proliferacji i hipertrofii komórkowej, przyczynia się do wzrostu ciała ludzkiego i jego narządów.

Opis cyklu komórkowego

Najważniejszymi procesami zachodzącymi w cyklu komórkowym są:

- podwojenie ilości DNA (genomu) oraz podwojenie i wierne odtworzenie przestrzenne stanu epigenetycznego komórki (epigenomu),
- precyzyjne rozdzielenie genomu i epigenomu między potomne komórki.

Podwojenie ilości DNA znane jest także jako **replikacja** lub **programowana synteza DNA** zachodząca według sposobu semikonserwatywnego (zob. rozdz. 1). Replikacja DNA odbywa się w wydzielonym czasie cyklu komórkowego, czyli w **fazie syntezy DNA (fazie S).** W fazie S ilość DNA w komórkach diploidalnych człowieka wzrasta z 6 do 12 pg, a łączna długość jego cząsteczek z ok. 1,8 m do ok. 3,6 m. Dzięki temu potomne komórki otrzymują po 6 pg DNA i taką samą liczbę genów, jaką miała komórka-matka.

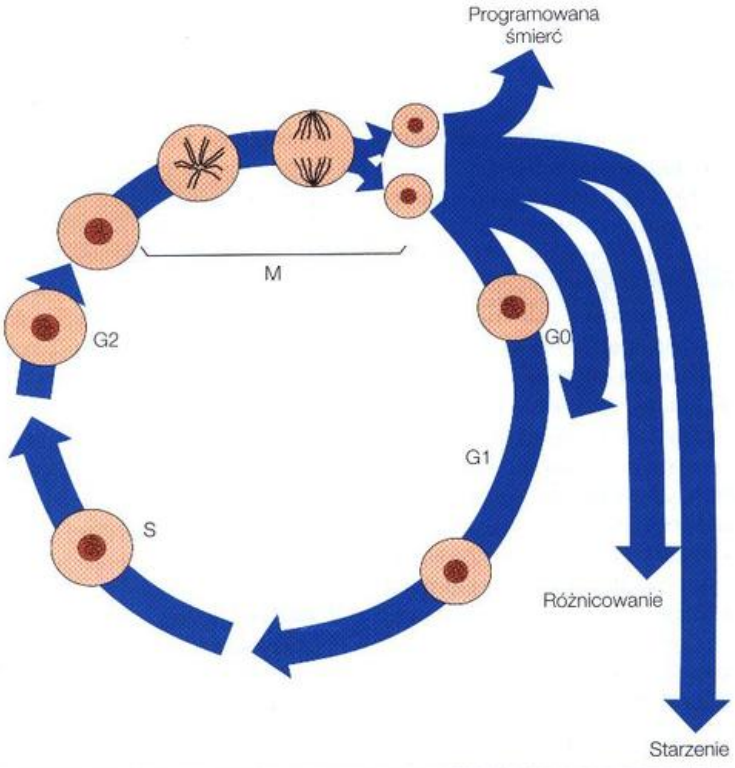
Rekonstrukcja i podwojenie stanu epigenetycznego komórki zachodzi w fazie S i G2 cyklu komórkowego. Składa się na nią hemimetylacja ich cytozyny na nowych niciach DNA oraz odbudowa i rozmieszczenie nukleosomów wraz z ich kodem histonowym. Dzięki temu komórki potomne przenoszą wiernie przez cykl komórkowy cechy epigenomu komórki-matki.

Natomiast rozdzielenie materiału genetycznego i epigenetycznego oraz podział komórki zachodzą w **fazie mitozy (fazie M).** Poza tymi fazami wyróżnia się w cyklu komórkowym **fazę G1** (ang. *gap*, przerwa), tj. czas między zakończeniem fazy M i rozpoczęciem fazy S, oraz **fazę G2**, tj. czas między zakończeniem fazy S a rozpoczęciem fazy M (ryc. 3.1). Fazy G1+S+G2 nazywane są wspólnie **interfazą.**

Czas trwania cyklu komórkowego waha się w szerokich granicach. Na przykład u bakterii cykl trwa ok. 30 min, w przedimplantacyjnym rozwoju zarodkowym wynosi 4–12 godzin, a dla większości somatycznych komórek człowieka trwa do 24 godzin.

Faza G1

Po zakończeniu mitozy komórki wchodzą w fazę G1 cyklu. Czas trwania fazy G1 jest zmienny i waha się od kilku do kilkunastu godzin. Rozpoczyna się synteza RNA i białek, wśród których znajdują się białka strukturalne, białka regulatorowe cyklu komórkowego – **cykliny,** oraz enzymy napędzające cykl – **kinazy białkowe zależne od cyklin, CDK** oraz inne kinazy. Komórki, które podejmują decyzję o podziale, muszą w fazie G1 sforsować **punkt restrykcyjny (R)** cyklu, tj. przezwyciężyć kompetycyjnie inhibitor CKI – p16 (jeden z inhibitorów CDK, wiązany przez CDK4/6) oraz zgromadzić zestaw białek regulatorowych i enzymatycznych potrzebnych do rozpoczęcia fazy S. Kompleksami białek regulatorowych i enzymatycznych przeprowadzających komórki przez fazę G1 są: cyklina D1/CDK4, cyklinaD2/CDK4 oraz cyklina D3/CDK6 (wspólnie nazywane cyklinami/CDK fazy G1). Normalnie CDK4/6 są związane z białkiem – inhibitorem p16, który nie pozwala się im wiązać z cyklinami D. Jednak po zadziałaniu sygnału do włączenia cyklu, np. po związaniu cytokiny z receptorem powierzchni komórki, cyklina D1 jest produkowana w nadmiarze, wypierając kompetycyjnie p16 z CDK4/6. Wtedy cykliny wiążą się z CDK, pozwalając na związanie CDK z ATP. Następnie kinaza CAK (ang. *CDK activating kinase*) fosforyluje treoninę CDK w pozycji 16, przyczyniając się do pełnej aktywności CDK. Kompleksy cyklina D/CDK4/6 fosforylują i unieczynniają następnie **białko RB** kompleksu RB/E2F. To aktywuje **czynnik transkrypcji E2F** i transkrypcję cyklin E, A i polimerazy DNA oraz



Rycina 3.1 Schemat cyklu komórkowego składającego się z fazy G1, S, G2 i M. W mitozie (M) odróżnia się profazę, metafazę, anafazę i telofazę. W czasie cyklu wzrastają masa i wielkość komórek (hipertrofia). Pokazano także losy komórek po zakończeniu fazy M: mogą one wchodzić do stanu spoczynkowego G0, ginąć śmiercią samobójczą, różnicować się, zmieniając swój stan epigenetyczny, lub wchodzić na drogę starzenia.

przejście G1 → S napędzane przez kompleks cyklina E/CDK2.

Punkt R jest także punktem kontrolnym (ang. *check point*), w którym monitorowana jest prawidłowość struktury DNA. Wszelkie uszkodzenia DNA powodują zatrzymanie cyklu komórkowego z udziałem **kinazy Chk2** (ang. *checkpoint kinase 2*, kinaza punktu kontrolnego 2), która wtedy hamuje fosfatazę CDC25, zatrzymując komórkę w fazie G1. Mutacje kinazy Chk2 (np. delecja nukleotydu w pozycji 1100) prowadzą do 2–3-krotnego zwiększenia ryzyka pojawienia się raka gruczołu mlekowego. Inne mutacje kinazy Chk2 prowadzą do rozwoju mięsaków i guzów mózgu.

Wiele komórek, szczególnie w organizmie dorosłym, opuszcza fazę G1 przed osiągnięciem punktu restrykcyjnego. Mogą one wchodzić do spoczynkowego **stanu G0**, a z niego, pod wpływem czynników zewnętrznych, np. cytokin, mogą powrócić do cyklu komórkowego. Z fazy G1 komórki mogą również wchodzić na drogę **różnicowania, starzenia** lub **samobójczej śmierci** (ryc. 3.1).

Cykl centrosomowy. W fazie G1 i fazie S cyklu komórkowego następuje także podział centrioli i centrosomów zachodzący w **cyklu centrosomowym** regulowanym przez cykliny A i E. Dwie centriole ułożone względem siebie pod kątem prostym pod koniec fazy G1 i w fazie S podwajają się, w wyniku czego w fazie G2 istnieją dwie pary centrioli.

Faza S

Komórki wchodzą w fazę S po zsyntetyzowaniu cyklin E i A oraz ich związaniu z CDK2. Kompleksy cyklina E, A/CDK2 (wspólnie nazywane także cyklinami/CDK fazy S) są transportowane do jądra i przygotowują komórkę do replikacji DNA, czyli **programowanej syntezy DNA,** a także replikacji centromerów oraz białek epigenomu.

Podwojenie genomu. Synteza DNA odbywa się według sposobu semikonserwatywnego (zob. rozdz. 1), rozpoczynając się niejednocześnie w kilkunastu tysiącach miejsc cząsteczek DNA jądra nazywanych **punktami startowymi replikacji DNA.** Na ogół DNA chromatyny rozproszonej, czyli

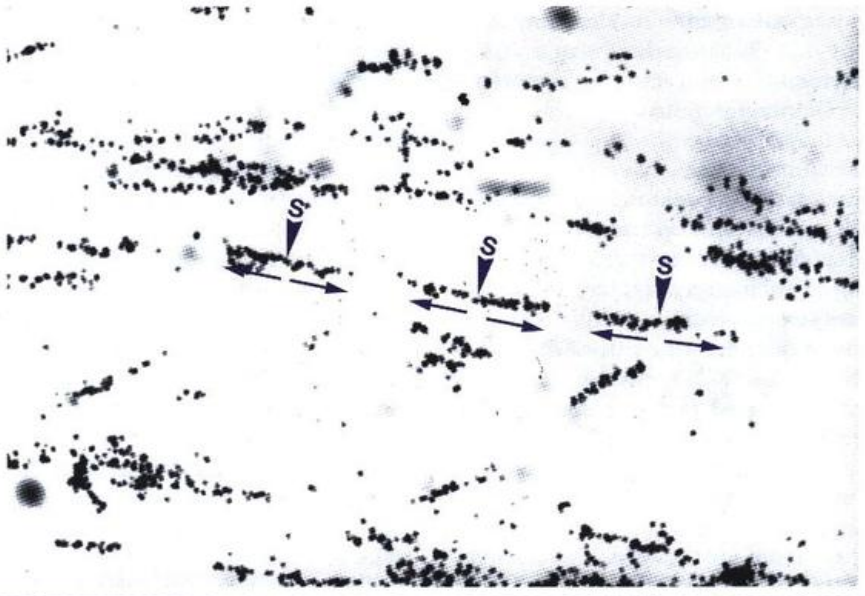
euchromatyny, jest replikowany wcześniej, a DNA chromatyny zbitej – heterochromatyny – później. Z każdego punktu startowego synteza DNA postępuje dwukierunkowo (ryc. 3.2) z prędkością 10–100 nukleotydów/s. Dzięki tak dużej liczbie punktów startowych wszystkie cząsteczki DNA komórek diploidalnych człowieka o łącznej długości 1,8 m są replikowane w ciągu 6–8 godzin. Gdyby synteza DNA rozpoczynała się tylko w jednym punkcie startowym, to przy jej prędkości i 3 miliardach par nukleotydów DNA jądra czas syntezy wynosiłby ok. 1500 dni.

Replikacji w fazie S podlega cały DNA jądrowy i większość cząsteczek DNA mitochondrialnego. Syntezę DNA jądra przeprowadzają kompleksy białkowe – **replikony,** które należą do macierzy jądra. Głównymi składnikami replikonów są helikaza oraz polimerazy DNA α i δ. Białko motorowe – helikaza, rozdziela podwójną helisę DNA i wytwarza widełki replikacyjne, w skład których wchodzą dwa ramiona jednoniciowego matczynego DNA. Synteza DNA, tj. dodawanie komplementarnych nukleotydów do nukleotydów matczynego DNA, jest prowadzona przez polimerazy DNA z wytworzeniem nowych nici DNA na nici wiodącej i opóźnionej (zob. ryc. 1.4).

Wynikiem syntezy DNA jest powstanie dwóch helis DNA z jednej, matczynej helisy. Helisy wytwarzają dwie chromatydy siostrzane, tworzące rozproszony chromosom. Specjalne białko, **kohezyna-SA2,** łączy centromery nowo powstałych siostrzanych chromatyd, a **kohezyna-SA1** łączy ich telomery z udziałem kompleksu PCNA (ang. *proliferating cell nuclear antigen* – antygen jądrowy proliferujących komórek).

Replikacja DNA w tym samym cyklu zachodzi tylko raz, co zapobiega poli- i aneuploidii.

Nieprogramowana synteza (reperacja) DNA może zachodzić w fazach S, G1 i G2 cyklu. Jeśli w czasie syntezy DNA powstaje błąd lub jeśli DNA jest uszkodzony, wówczas włączane są mechanizmy **punktów kontrolnych faz S/G1/G2**. Główny naprawczy system nazywany **mechanizmem reperacji DNA** przyczynia się do dużej stabilności genomu i kontrolowany jest przez dwie nadrzędne kinazy – **ATM** (ang. *ataxia teleangiectasia mutated*) i **ATR** (ang. *ataxia teleangiectasia and Rad3 related*) z udziałem białka motorowego – helikazy i innych białek. Kinaza ATM wyłącza cykl komórkowy z udziałem kinazy WEE w odpowiedzi na uszkodzenia DNA, np. pęknięcie obu jego nici, a kinaza ATR czyni to samo w odpowiedzi na zaburzenia w pracy widełek replikacyjnych. Jeśli reperacja DNA jest niemożliwa, następuje aktywacja białka p53, które włącza program śmierci komórki, niszcząc błędny DNA razem z komórką. Efektywność reperacji DNA zależy od rodzaju i wieku komórki oraz od jej otoczenia.



Rycina 3.2 Autoradiogram izolowanych cząsteczek DNA znakowanych trytowaną tymidyną i widocznych w postaci szeregów ziaren. S – punkty startowe replikacji, od których synteza DNA biegnie dwukierunkowo (*strzałki*).

Mechanizm reperacji DNA jest używany także do wycinania zmetylowanej cytozyny DNA i zastępowania jej cytozyną niezmetylowaną jako sposób uczynnienia wyciszonych metylacją genów w epigenetycznym reprogramowaniu, m. in. komórek płciowych.

Podwojenie i odtworzenie epigenomu. W fazie S, ale także częściowo w fazie G2, następuje podwojenie i wierna odbudowa stanu epigenetycznego komórki, tj. hemimetylacja *de novo* cytozyny (występującej w parach z guaniną, CG) na nowej nici DNA oraz utrzymanie wzorca miejsc metylacji na matczynej nici, a także odtworzenie nukleosomów wraz z ich kodem histonowym. Dzięki temu komórka-matka po przejściu przez cykl komórkowy przekazuje wiernie komórkom potomnym nie tylko swój stan genetyczny, ale i epigenetyczny, co powoduje, że komórki potomne są identyczne z komórką-matką. Przekazanie cech epigenetycznych poprzez cykl komórkowy znane jest jako ***bookmarking*** lub **pamięć komórkowa.** W *bookmarkingu* bierze głównie udział białko **PCNA** (ang. *proliferating cell nuclear antigen*, antygen komórek proliferujących), które wiąże enzymy potrzebne do metylacji/demetylacji DNA i modyfikacji histonów. W podobny sposób odtwarzany jest kod histonowy nukleosomów nowej nici DNA. Biorą w nim udział PCNA i białka opiekuńcze: NAP-1 – przemieszcza histony do jądra, oraz CAF-1 i HIRA – łączą i odłączają histony z DNA i od DNA. Podwojony DNA z odtworzonymi wiernie miejscami metylacji jego cytozyny oraz odtworzone nukleosomy z ich kodem histonowym odzwierciedlają stan epigenetyczny chromatyny, która powstanie w komórkach potomnych po zakończeniu mitozy.

Faza G2

Faza G2 rozpoczyna się od zakończenia replikacji DNA i trwa do wejścia komórki w mitozę. Trwa zazwyczaj 2–4 godziny. W tym czasie komórki syntetyzują białka regulatorowe i enzymatyczne potrzebne do wejścia komórki w fazę M oraz dodatkową powierzchnię błony komórkowej, w postaci pęcherzyków, zużywaną później, w czasie cytokinezy. Przejście przez fazę G2 oraz G2 → M zapewnia kompleks cyklina B/CDK1 (nazywany także MPF, ang. *M-phase promoting factor* – czynnik pobudzający fazę M), współdziałający z fosfatazą CDC25 i kinazą WEE.

Ważną rolę w przejściu G2 → M i w przechodzeniu komórki przez fazę M odgrywają również **kinazy Polo (Plk),** które:

- aktywują kompleksy cyklina/CDK,
- aktywują fosfatazy CDK25,
- powodują dojrzewanie centrosomów,
- biorą udział w powstawaniu wrzeciona podziałowego,
- aktywują kompleks anafazowy (APC),
- biorą udział w wytwarzaniu pierścienia kurczliwego w cytokinezie.

Uszkodzone komórki, najczęściej przez promienie UV i stres oksydacyjny, są hamowane **w punkcie kontrolnym fazy G2** przez:

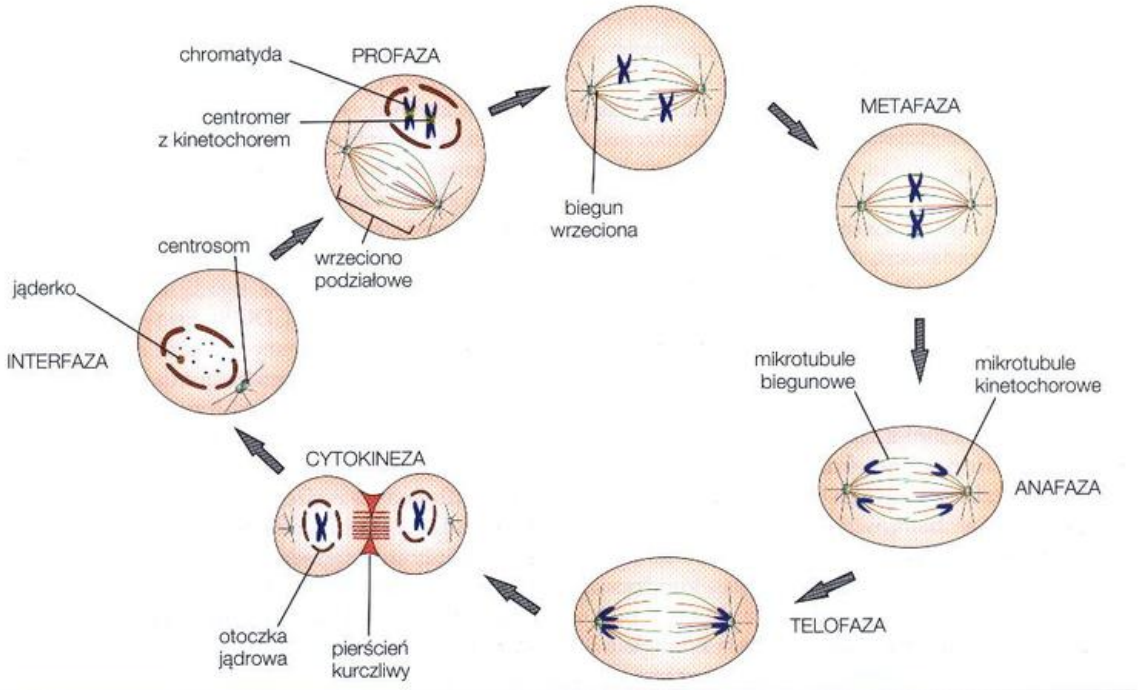
- aktywację białka p53, które unieczynnia CDK1,
- aktywację kinazy Chk2 unieczynniającej fosfatazę CDC25 i CDK1. Komórka zostaje zatrzymana w fazie G2.

Również **komórki nienormalnie małe,** które nie zdążyły zgromadzić odpowiedniej liczby makrocząsteczek, są zatrzymywane w fazie G2 **(punkt kontrolny wielkości komórek fazy G2)**, do czasu przyrostu ich wielkości odpowiadającej normie. Na obwodzie zbyt małej komórki cząsteczki kinazy POM1 są ściśle upakowane w jej środkowej części, co hamuje kinazę CDR2, która aktywuje wtedy kinazę WEE1. Ta z kolei hamuje zależną od cykliny kinazę CDK1 i zatrzymuje przejście G2 → M. Kiedy wskutek hipertrofii komórka staje się większa, koncentracja kinazy POM1 w jej środkowej części obniża się, co aktywuje kinazę CDR2, która hamuje kinazę WEE1. To uczynnia CDK1 i przejście G2 → M. Udział w mechanizmie działania punktu kontrolnego wielkości komórek ma także białko RB.

Faza M (mitoza)

Faza M, czyli mitoza, trwa w komórkach ssaków zwykle 30–180 min i składa się z dwóch etapów: **podziału jądra**, czyli **kariokinezy,** i **podziału cytoplazmy,** czyli **cytokinezy.** W czasie kariokinezy następuje zanik organizacji jądra interfazowego, kondensacja chromatyny z wytworzeniem chromosomów mitotycznych oraz rozdzielenie siostrzanych chromatyd każdego chromosomu, które jako odrębne chromosomy przemieszczane są do komórek potomnych. Procesom tym towarzyszy wytworzenie, a następnie rozpad **wrzeciona podziałowego** oraz fragmentacja, a następnie rekonstrukcja otoczki jądrowej i jąderka (ek). W wyniku cytokinezy powstają z jednej komórki-matki dwie komórki potomne (ryc. 3.3).

Zmiany zachodzące w komórce w czasie kariokinezy są ujmowane tradycyjnie w cztery fazy: **profazę, metafazę, anafazę i telofazę.** Niekiedy wyróżnia się także **prometafazę.**



Rycina 3.3 Schemat pokazujący przebieg mitozy.

Profaza

W profazie następuje:

- kondensacja chromatyny i wytworzenie chromosomów mitotycznych,
- reorganizacja cytoszkieletu komórki i wytworzenie wrzeciona podziałowego,
- zanik struktury jądra interfazowego (w prometafazie), poprzedzony rozpadem otoczki jądrowej i zanikiem jąderka(ek).

Pierwszą oznaką wchodzenia komórki w mitozę jest kondensacja chromatyny. Kondensacja ułatwia precyzyjne rozdzielenie genomu i epigenomu do potomnych komórek w anafazie. W wyniku kondensacji w jądrze komórki pojawiają się **chromosomy mitotyczne**. Chromosomy wczesnej profazy mają wygląd długich, cienkich nici. Każdy chromosom składa się z dwóch chromatyd połączonych ściśle ze sobą na całej ich długości. W późnej profazie centromer każdego chromosomu jest otaczany kompleksami białkowymi, tworzącymi **kinetochor**. Pełni on dwie funkcje:

- wiąże mikrotubule kinetochorowe wrzeciona podziałowego,
- przyczynia się w anafazie do ściągania chromatyd do biegunów komórki, gdyż wśród jego białek znajdują się białka motorowe mikrotubuli – kinezyny. W skład kinetochoru wchodzą ponadto białka, które odgrywają ważną rolę przy rozdzielaniu chromatyd w anafazie oraz przy hamowaniu mitozy (punkt kontrolny wrzeciona podziałowego), kiedy występuje defekt nieprzyłączenia choćby jednego chromosomu do mikrotubuli kinetochorowej. Zapobiega to powstawaniu aneuploidii.

Proces **kondensacji chromatyny**, a później chromosomów, postępuje stopniowo w profazie i metafazie, prowadząc do wykształcenia w pełni skondensowanych chromosomów metafazowych. Kondensację chromosomów wywołują kompleksy białkowe – **kondensyny**, posiadające aktywność ATP-azową. Ich cząsteczki mają kształt litery V i są białkami motorowymi. Kondensyna wiąże się końcami swoich cząsteczek z nukleosomami. W interfazie jest nieaktywna, a na początku profazy jest fosforylowana przez CDK1 kompleksu cyklina B/CDK1 i uaktywniana. Cząsteczki aktywnej kondensyny hydrolizują ATP, a energię zużywają na ruchy zbliżania/oddalania swoich ramion do i od siebie. Ruchy te powodują skracanie struktur chromatyny, powstawanie pętli i pogrubienie całych chromatyd, czyli ich kondensację.

W profazie **zanika** także **jąderko,** co wiąże się z ok. 90% spadkiem anabolizmu w czasie mitozy.

Wrzeciono podziałowe

Centrosomy przemieszczają się ku zewnętrznym częściom komórki, stając się jej biegunami. Centrosfery tych centrosomów są ośrodkami polimeryzacji mikrotubuli, które wydłużają się w kierunku środka komórki.

W ten sposób powstaje **wrzeciono podziałowe**, które jest strukturą dwubiegunową, zbudowaną z mikrotubuli połączonych z białkami towarzyszącymi mikrotubulom (MAP) oraz z innymi białkami. U biegunów wrzeciona znajdują się centrosomy (ryc. 3.4), od których odchodzą **mikrotubule kinetochorowe, ramienne, biegunowe i astralne.**

Prometafaza i metafaza

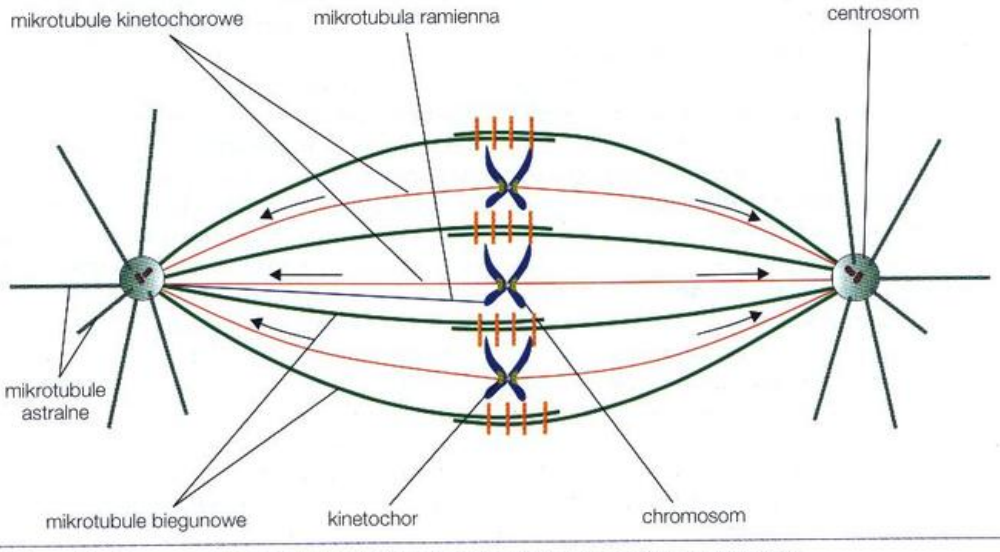
W prometafazie następuje **rozerwanie i pofragmentowanie otoczki jądrowej.** Dokonuje się to z pomocą kompleksów białkowych dyneiny/dynaktyny/ /białka p150 związanych z otoczką jądrową.

W czasie metafazy chromosomy kondensują dalej, do czasu, kiedy wszystkie znajdą się w płaszczyźnie równikowej komórki. Typowa konfiguracja chromosomów metafazowych oglądanych z góry przypomina gwiazdę (nazywaną gwiazdą macierzystą), a oglądana z boku – płytkę (nazywaną płytką równikową). Jednocześnie składniki cytoplazmy przemieszczają się ku biegunom komórki. Przemieszczanie to ma prędkość ok. 1 μm/min i ma na celu przekazanie do komórek potomnych równych ilości składników cytoplazmy.

Anafaza

Pod koniec metafazy centromery chromatyd siostrzanych są połączone kompleksami białkowymi – **kohezynami,** w skład których wchodzą także proteaza – **separyna,** i unieczynniające ją białko – **sekuryna.** Na początku anafazy sekuryna jest defosforylowana przez fosfatazę CDC25 i w takiej postaci jest trawiona w proteasomach z udziałem **kompleksu anafazowego APC** (nazywanego także cyklosomem), który jest ligazą ubikwityny aktywowaną przez białko CDC20. Strawienie sekuryny aktywuje proteazę-separynę, która z kolei trawi kohezyny – białka łączące chromatydy między sobą. Powoduje to uwolnienie chromatyd (nazywanych od tej chwili chromosomami) i ich przemieszczanie ku biegunom komórki. Przemieszczanie chromosomów odbywa się ze średnią prędkością 2,5 μm/min. Mechanizmy ruchu chromosomów są następujące:

- ślizganie się względem siebie mikrotubuli biegunowych z udziałem kinezyny, co oddala od siebie centrosomy i wydłuża wrzeciono podziałowe,
- ślizganie się mikrotubuli astralnych względem sieci filamentów aktynowych podbłonowej części komórki z udziałem dynein, co powoduje przesuwanie chromosomów ku centrosomom i oddalanie się od siebie centrosomów,
- ślizganie się ramion chromosomów względem mikrotubuli ramiennych z udziałem chromokinezyny, co powoduje ruch chromosomów do końców *plus* mikrotubuli i ich układanie się w płytkę równikową (w metafazie),



Rycina 3.4 Schemat budowy wrzeciona podziałowego. Strzałki pokazują kierunek ruchu chromosomów.

- ślizganie się kinetochorów względem mikrotubuli kinetochorowych z udziałem kinezyny i dyneiny cytoplazmatycznej, co powoduje ruch chromosomów ku centrosomom.

Punkt kontrolny wrzeciona podziałowego. Jeśli któryś z chromosomów nie przyłączy się do mikrotubuli kinetochorowej lub jeśli istnieje inny defekt wrzeciona, wówczas włącza się mechanizm hamowania mitozy w metafazie, zapobiegający hipo-, poli- lub aneuploidii.

Telofaza

Po doprowadzeniu chromosomów do biegunów komórki rozpoczyna się rekonstrukcja jąder komórkowych, czyli telofaza. Chromosomy dekondensują się, stają się coraz cieńsze i dłuższe, a ich zbita konstrukcja się rozluźnia. Przywrócona zostaje transkrypcja DNA, w tym także transkrypcja rDNA rozproszonych chromosomów jąderkotwórczych, co przyczynia się do odbudowy struktury jąderka. Następuje defosforylacja nukleoliny i białka B23 jąderka, wrzeciono podziałowe się rozpada. Odtwarzana jest także otoczka jądrowa powstająca z przechowanych jej fragmentów. Odtworzona zostaje także blaszka jądrowa po defosforylacji jej lamin.

Każdy zdekondensowany chromosom otaczany jest przez **kompleksy białek CTCF** (ang. CCCTC-binding *factor*, czynnik wiążący się z sekwencją CCCTC DNA). Białka te pełnią ważne funkcje:

- utrzymują architekturę chromatyny interfazowej,
- izolują chromosomy od czynników zmieniających stan epigenetyczny komórki (metylujących cytozynę DNA, zmieniających kod histonowy),
- pobudzają transkrypcję.

Cytokineza

Cytokineza jest końcowym etapem podziału komórki, w którym następuje podział cytoplazmy i wytworzenie dwóch odrębnych komórek (ryc. 3.3). Rozpoczyna się pod koniec anafazy lub na początku telofazy wytworzeniem **pierścienia kurczliwego,** powstającego zazwyczaj w środkowej części wrzeciona podziałowego i w płaszczyźnie prostopadłej do jego długiej osi. Pierścień składa się głównie z filamentów aktynowych oraz białek związanych z aktyną – ABP, przede wszystkim białka motorowego – miozyny II. W wytwarzaniu pierścienia bierze także udział kinaza RHO (ROCK), fosforylująca i inaktywująca małe GTP-azy (białka RHO). Zwiększa to liczbę filamentów aktynowych oraz ich stabilizację.

Stopniowe kurczenie się pierścienia prowadzi do powstania bruzdy podziałowej, a następnie całkowitego rozdzielenia komórek. Istnieją dwa mechanizmy skurczu pierścienia:

- Kinaza RHO (ROCK) fosforyluje i inaktywuje enzym – fosfatazę łańcuchów lekkich miozyny (MLCP). To z kolei hamuje defosforylację kinazy łańcuchów lekkich miozyny (MLCK) i wywołuje **uczulenie na Ca^{2+},** prowadząc do ślizgania się filamentów aktynowych względem miozyny II przy niezmieniającym się stężeniu Ca^{2+}.
- Kinaza RHO fosforyluje łańcuchy lekkie miozyny II (MLC), co włącza aktywność ATP-azową łańcuchów ciężkich miozyny II. Miozyna przesuwa wtedy filamenty aktynowe, powodując zaciskanie pierścienia kurczliwego.

Postępujący skurcz pierścienia kurczliwego doprowadza do zwężenia cytoplazmy i wytworzenia struktury nazywanej ciałkiem środkowym oraz do zatrzymania skurczu.

Losy komórek wczesnej fazy G1. Stan G0

Komórki po zakończeniu mitozy wchodzą we wczesną fazę G1. W zależności od ich stanu epigenetycznego oraz działających na nie sygnałów z zewnątrz losy komórek mogą być następujące (ryc. 3.1):

- Po sforsowaniu punktu restrykcyjnego mogą wchodzić w następny cykl komórkowy. Przykładem są komórki przedimplantacyjnych zarodków, komórki macierzyste, komórki guzów złośliwych oraz komórki tkanek odnawiających się.
- Komórki mogą opuścić cykl, włączyć program śmierci samobójczej i zginąć.
- Komórki opuszczają cykl, przeprogramowują swój stan epigenetyczny, przestają się dzielić i różnicują się (specjalizują). Przykładem są komórki nabłonka jelita: enterocyty, komórki Panetha, komórki kubkowe i in.
- Komórki opuszczają cykl i wchodzą na drogę starzenia.
- Komórki opuszczają cykl i wchodzą w stan spoczynkowy G0, w którym mogą przebywać przez długi czas, a potem pod wpływem sygnałów z zewnątrz mogą powrócić do cyklu komórkowego. Przykładem są limfocyty, które pod wpływem właściwego antygenu wchodzą w cykl komórkowy.

Przejście G0 → G1, podobnie jak przejście G1 → S, odbywa się z udziałem białka RB, ale kompleksem napędzającym jest cyklina C/CDK3. Cyklina C łączy się z CDK3, następuje fosforylacja RB, uwolnienie E2F z kompleksu RB/E2F oraz transkrypcja cyklin/CDK fazy G1 i przejścia G1 → S. Zmiany te poprze-

dza modyfikacja stanu epigenetycznego komórki – metylacji cytozyny DNA i kodu histonowego.

Odmiana cyklu komórkowego: endoreduplikacja

Istnieje odmiana cyklu komórkowego nazywana endoreduplikacją, w której występuje synteza genomu i epigenomu, powielane są chromosomy, ale mitoza jest niepełna lub nie ma jej wcale. Prowadzi to do poliploidyzacji i/lub wytworzenia komórek dwujądrowych. Jest to prosty i zużywający niewiele energii sposób powielenia liczby genów w komórce, z pominięciem reorganizacji cytoszkieletu i wytwarzania wrzeciona podziałowego oraz dodatkowej syntezy błon komórkowych potrzebnych dla przeprowadzenia kariokinezy i cytokinezy.

U ssaków endoreduplikacja występuje w komórkach odżywiających zarodki – w trofoblaście i doczesnej. Występuje także w megakariocytach produkujących płytki krwi oraz w hepatocytach.

Regulacja cyklu komórkowego

Regulacja cyklu komórkowego jest jednym z najbardziej złożonych, precyzyjnych i fascynujących zjawisk cytofizjologicznych. Cykl komórkowy jest napędzany i regulowany wieloma białkami i ich kompleksami.

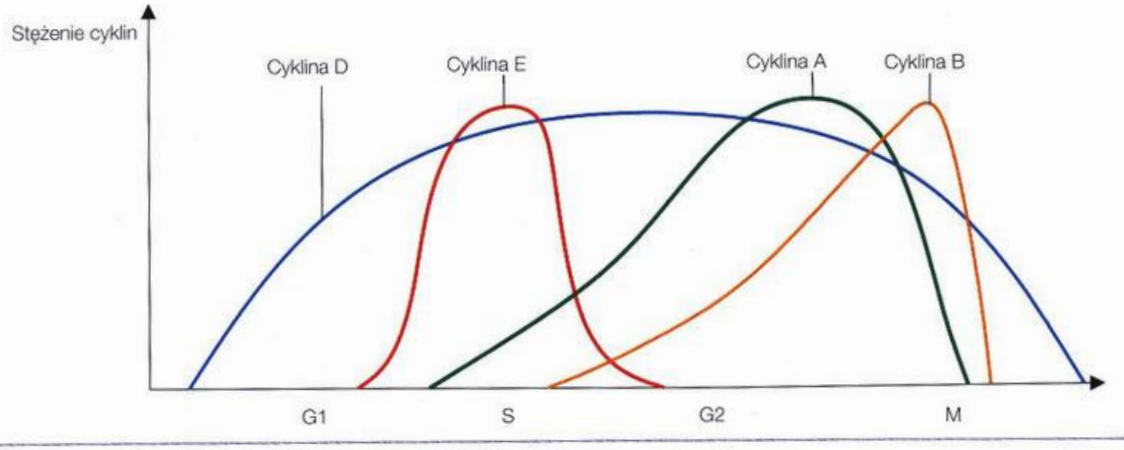
Jednym z głównych białek włączających/wyłączających cykl komórkowy jest **mTOR** (ang. *mammalian target of rapamycin*, wiązanie rapamycyny u ssaków) i jej szlaki sygnałowe. mTOR jest kinazą występującą w kompleksie z innymi białkami (mTORC1,2), które regulują metabolizm, stężenie substancji odżywczych (aminokwasy, kwasy tłuszczowe i in.) oraz zasoby energetyczne komórek. Są także czujnikami stężenia substancji odżywczych, tlenu, energii i cytokin. Jeśli warunki są sprzyjające, mTORC włącza inne szlaki sygnałowe prowadzące do rozpoczęcia i przeprowadzenia cyklu komórkowego. Jeśli warunki są niesprzyjające, cykl komórkowy nie jest włączany. Innym ważnym białkiem regulującym cykl komórkowy, szczególnie w układzie immunologicznym, jest czynnik transkrypcji **NFkB** i jego szlaki sygnałowe.

Białka biorące bezpośredni udział w regulacji cyklu są kodowane przez **geny cyklu komórkowego.** Geny cyklu, których produkty białkowe pobudzają cykl, nazywane są **protoonkogenami.** Zmutowane protoonkogeny nazywane są **onkogenami** i wywołują transformację normalnych komórek w komórki nowotworowe. Protoonkogeny i onkogeny ludzkie oznacza się zazwyczaj trzema literami, np. *FOS, JUN, MAF, SRC.* Protoonkogeny komórkowe oznacza się literą „*c*" (ang. *cell*, komórka), np. gen *c-FOS*, c-*JUN*, itp., a onkogeny wirusowe literą „*v*" (ang. *virus*, wywołujący nowotwór), np. gen *v-FOS*, *v-JUN* itp.

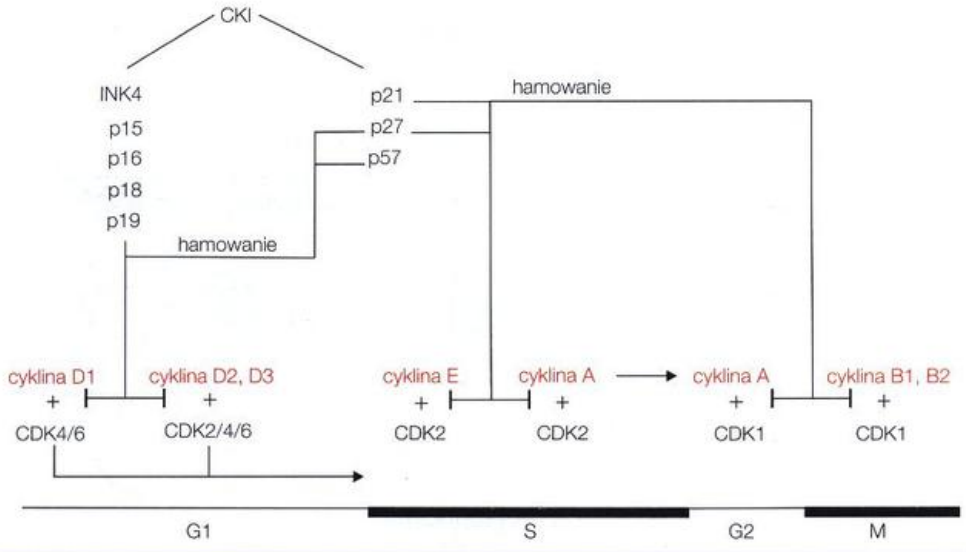
Geny, których produkty białkowe hamują cykl komórkowy, nazywane są **genami supresorowymi.**

Produkty białkowe protoonkogenów są liczne i należą do nich:

- **białkowe kinazy zależne od cyklin** (**CDK,** ang. *cyclin dependent kinases*), które fosforylują białka,
- białka regulatorowe – **cykliny,** które aktywują kinazy białkowe (ryc. 3.5, ryc. 3.6),
- **fosfatazy** (defosforylują białka),
- **białka przekazujące sygnały** poprzez cytoplazmę,
- **czynniki transkrypcji,**
- **białka receptorowe,**
- **cytokiny.**



Rycina 3.5 Wzrost i spadek stężenia cyklin D, E, A i B w fazie G1, S, G2 i M cyklu komórkowego.



Rycina 3.6 Diagram pokazujący regulację cyklu komórkowego w czasie. Różne cykliny i CDK wytwarzają aktywne kompleksy przeprowadzające komórki przez fazy G1, S, G2 i M. Pokazano także inhibitory cyklu, CKI, hamujące cykl w różnych fazach.

Produkowane w cytoplazmie cykliny i CDK transportowane są do jąder, a z nich z powrotem do cytoplazmy, stwarzając różnorodność oddziaływań w napędzaniu i regulacji cyklu komórkowego (ryc. 3.7).

Natomiast **geny supresorowe** kodują białka głównie hamujące cykl komórkowy. Należą do nich białko RB (retinoblastoma), białko p53 oraz duże rodziny białek kodowanych przez geny *CIP/KIP* i *INK4a*. **Białko RB** (retinoblastoma) wiąże się z czynnikiem transkrypcji E2F, unieczynniając go. W fazie G1 cyklu RB jest fosforylowane przez CDK4, co uwalnia czynnik transkrypcji E2F, który rozpoczyna wtedy syntezę cyklin E i A i wiązanie się ich z CDK2, powodując przejście G1 → S.

Białko p53 jest czynnikiem transkrypcji aktywującym setki genów, których produkty białkowe:
- hamują cykl komórkowy,
- wywołują programowaną śmierć komórek,
- stabilizują genom, włączając mechanizmy naprawy DNA,
- wprowadzają komórki na drogę starzenia,
- wywołują autofagię.

W normalnych warunkach p53 jest rozkładany w proteasomach, po poliubikwitynacji z udziałem białka MDM – ligazy ubikwityny.

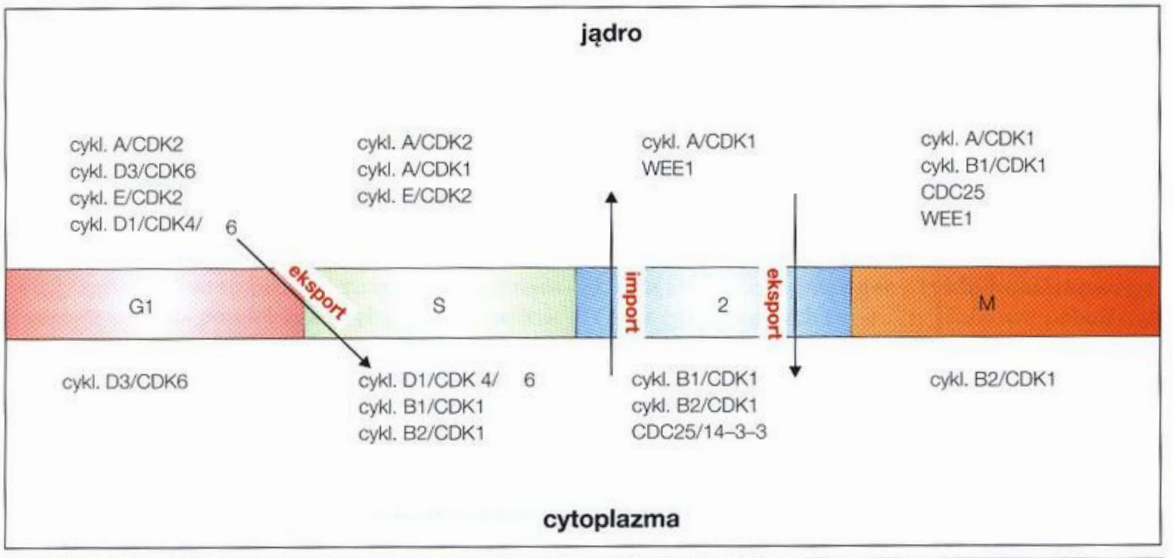
Indukcję p53 i jego aktywację wywołuje wiele sytuacji stresowych:
- uszkodzenie DNA,
- nieprawidłowa mitoza,
- zakażenia wirusowe,
- stres oksydacyjny,
- niedotlenienie,
- zaburzenia transkrypcji i inne.

Hamując cykl komórkowy, **p53 stanowi barierę** dla rozwoju wielu, jeśli nie wszystkich nowotworów. Mutacje genu *TP53* kodującego p53 występują w ok. 50% nowotworów złośliwych.

Do **białek inhibitorów cyklu komórkowego** kodowanych przez **gen *INK4*** należą: p15, p16, p18 i p19. Hamują cykl w fazie G1. Do białek kodowanych przez geny ***CIP/KIP*** należą: p21, p27, p57. Te ostatnie mogą hamować cykl w fazie G1 i M (ryc. 3.6), ale mogą także pobudzać cykl.

Regulacja cyklu komórkowego z zewnątrz

Cykl komórkowy i proliferacja komórek są precyzyjnie regulowane sygnałami z zewnątrz. Sygnały mają postać cząsteczek sygnałowych, którymi są najczęściej **cytokiny** (włącznie z czynnikami wzrostu i różnicowania), **hormony i cząsteczki istoty międzykomórkowej.** Przekazanie sygnału między komórkami odbywa się na drodze:
- **autokrynii,** która polega na uwolnieniu cząsteczek sygnałowych z komórek i na ich wiązaniu z receptorami tej samej lub takiej samej komórki,
- **parakrynii,** która polega na przekazaniu cząsteczek sygnałowych o krótkim okresie trwania do pobliskich komórek,



Rycina 3.7 Regulacja cyklu komórkowego w przestrzeni jądra i cytoplazmy. W fazach G1, S, G2 i M różne kompleksy cykliny (cykl)/CDK oraz kinaza WEE i fosfataza CDC25 (związana z białkiem 14–3–3) znajdują się albo w cytoplazmie, gdzie są wytwarzane, albo w jądrze.

- **hemokrynii (endokrynii),** kiedy cząsteczki sygnałowe rozprowadzane są z krwią,
- **jukstakrynii,** która polega na przekazywaniu sygnału przez wiążące się z sobą cząsteczki białek adhezyjnych dwóch przylegających do siebie komórek.

Receptory dla cząsteczek sygnałowych wzbudzających cykl komórkowy znajdują się najczęściej na powierzchni komórki, chociaż mogą występować w jądrze lub cytoplazmie. Najważniejsze z nich to:

- receptory posiadające aktywność kinazy tyrozynowej,
- receptory aktywujące kinazę JAK,
- receptory należące do rodziny białek G (ryc. 3.9),
- receptory wiążące hormony steroidowe.

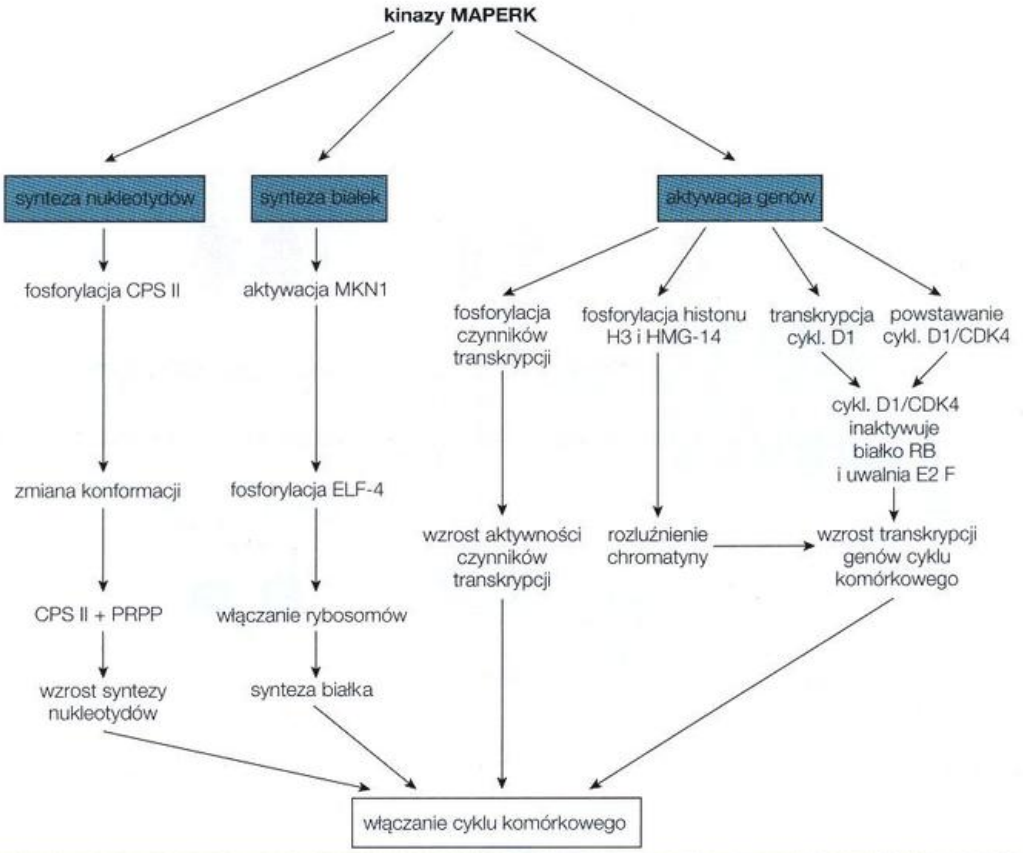
Przekazywanie (transdukcja) sygnału w komórce. Po przejściu przez błonę komórkową sygnały są przekazywane przez wiele, często krzyżujących się **szlaków transdukcji sygnałów** w cytoplazmie. Szlak transdukcji składa się z szeregu białek – kinaz, GTP-az i in., oraz informatorów wewnątrzkomórkowych – np. cAMP, Ca^{2+} i in., które kolejno przekazują sygnał poprzez cytoplazmę do jądra, wzbudzając transkrypcję protoonkogenów (lub onkogenów) i syntezę białek napędzających/regulujących lub hamujących cykl komórkowy. Szczególną rolę w przekazywaniu sygnałów zewnętrznych przez cytoplazmę odgrywają kinazy MAPERK (ang. *antygen-activated protein, extracellular-signal-regulated kinases*), tworzące szereg fosforylujących się enzymów. Wzbudzają one:

- syntezę nukleotydów – substratów dla syntezy DNA,
- syntezę białek,
- aktywują protoonkogeny i onkogeny (ryc. 3.8).

Rodzaje populacji komórkowych

Pod wpływem czynników wewnętrznych (przeprogramowanie stanu epigenetycznego) oraz zewnętrznych (cytokiny, hormony cząsteczki istoty międzykomórkowej) komórki organizmu dorosłego tworzą cztery populacje (ryc. 3.10):

- **Populację komórek macierzystych,** które zachowują zdolność do podziałów i różnicowania się przez całe życie człowieka; występują one w niszach tkankowych jako macierzyste komórki multipotentne hemocytopoezy, mezenchymatyczne, śródbłonka, nerwowe i grzebienia nerwowego, nabłonka jelita, jądra, gruczołu mlekowego, wątroby i nabłonka węchowego.
- **Populację odnawiającą się,** w której komórki dzielą się nieustannie, zastępując komórki zużyte. Należą do niej nabłonki, szpik kostny oraz komórki spermato- i oogenezy.
- **Populację spoczynkową,** której komórki znajdują się w stanie G0 cyklu komórkowego i dzielą się rzadko, ale pod wpływem sygnałów z zewnątrz wchodzą do fazy G1 i drastycznie przyspieszają podziały, prowadząc do regeneracji ubytków tkankowych. Należą do niej komórki wątroby, trzustki i nerki oraz fibroblasty, miocyty gładkie, komórki śródbłonka i limfocyty.

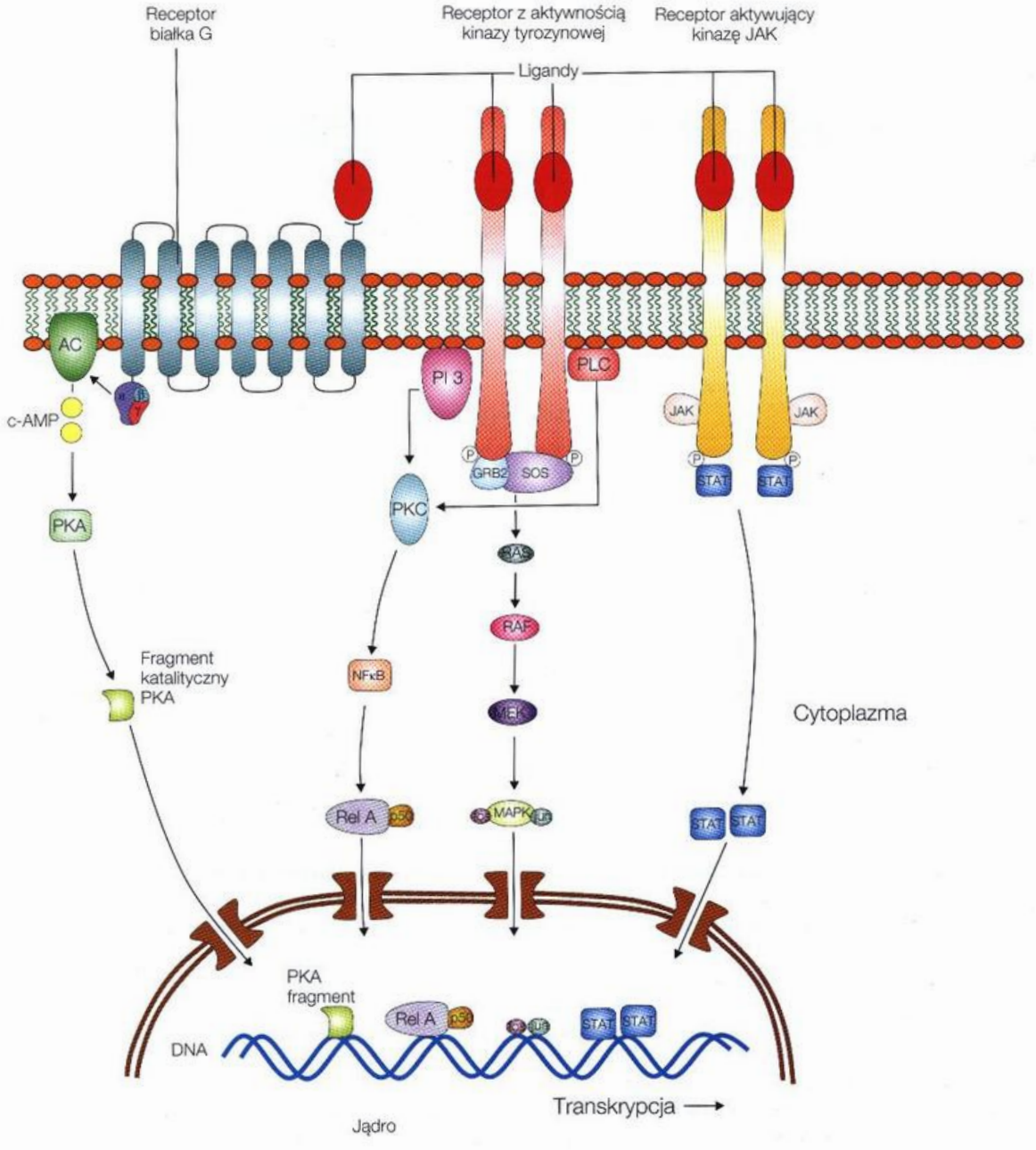


Rycina 3.8 Rola kinaz MAPERK (ang. *antygen-activated protein, extracellular-signal-regulated kinases*) w przekazywaniu sygnałów z zewnątrz (np. przez cytokiny). Kinazy MAPERK wzbudzają: syntezę nukleotydów – substratów dla syntezy DNA; syntezę białek; aktywują protoonkogeny i onkogeny. Cykl. – cykliny, CPSII – syntetaza karbamoilofosforanowa katalizująca syntezę nukleotydów, MNK1 – kinaza fosforylująca ELF4E (czynnik inicjacji translacji), PRPP – fosforybosylopirofosforan regulujący CPSII.

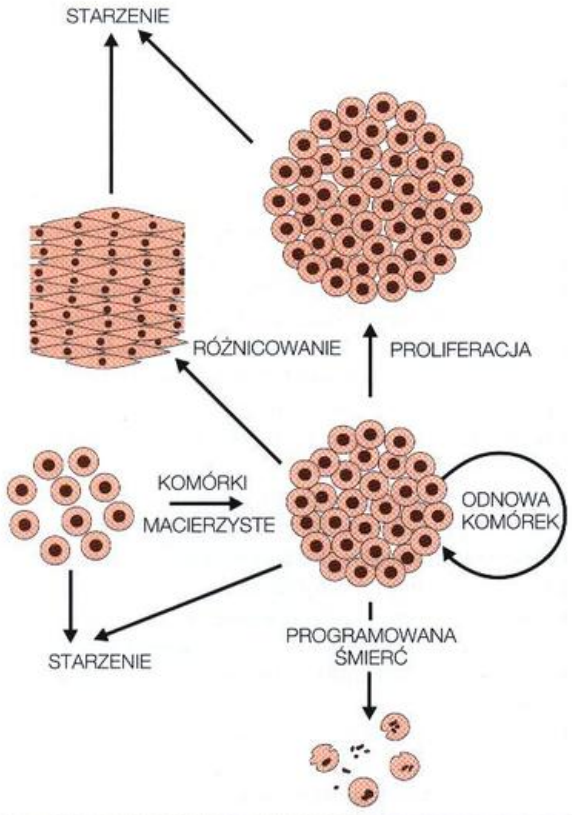
- **Populację komórek niedzielących się,** w których nastąpiło przeprogramowanie epigenomu, zróżnicowanie i utrata zdolności do podziałów. Należą do niej neurony, kardiomiocyty oraz komórki mięśni szkieletowych. Nie jest to jednak stan nieodwracalny, ponieważ stosowanie odpowiednich czynników transkrypcji wprowadza komórki tej populacji do cyklu komórkowego i odmładza je. Wszystkie te populacje komórek podlegają starzeniu (ryc. 3.10), które w miarę upływu wieku organizmu zmienia ich strukturę i ograniacza/zmienia ich funkcje.

Cykl komórkowy a wirusy

Cykl komórkowy może być modyfikowany przez wirusy. Większość wirusów zakażających ludzkie komórki uśmierca je. Jednak niektóre wirusy, np. **retrowirusy** lub **bornawirusy** (ich materiał genetyczny ma postać RNA) oraz **wirusy-DNA (adenowirusy, wirusy polioma, wirusy opryszczki i brodawczaków)** po wniknięciu do komórek potrafią wbudować fragment swojego genomu do ludzkiego lub zwierzęcego DNA. Przy czym retrowirusy-RNA po wniknięciu do komórki najpierw przepisują sekwencje swoich nukleotydów RNA na sekwencje komplementarnych nukleotydów DNA z pomocą własnego enzymu – odwrotnej transkryptazy. Takie fragmenty DNA wirusowego wbudowane do DNA, nazywane **endogennymi prowirusami,** stanowią do 8% ludzkiego genomu. Są przenoszone z pokolenia na pokolenie ludzi (lub zwierząt) za pośrednictwem komórek płciowych. Endogenne prowirusy regulują aktywność swoich genów, ale także wpływają na aktywność protoonkogenów, wywołując nadprodukcję ich RNA i białek. Szczególną rolę w patologii człowieka odgrywają prowirusy retrowirusów-RNA i wirusów polioma, które mają 1–2 wirusowe onkogeny, włą-



Rycina 3.9 Schemat przedstawiający w dużym uproszczeniu główne receptory (receptor białka G, receptor z aktywnością kinazy tyrozynowej i receptor aktywujący kinazę JAK) oraz ich szlaki transdukcji sygnałów uczestniczące w regulacji cyklu komórkowego (proliferacji komórkowej). Ligand po związaniu z receptorem przekazuje sygnał przez błonę komórkową, a następnie za pośrednictwem białek cytoplazmatycznych oraz informatorów wewnątrzkomórkowych (np. c-AMP) – do jądra, gdzie czynniki transkrypcji wspólnie z koaktywatorami i polimerazą RNA (nie pokazano) prowadzą transkrypcję genu. AC – cyklaza adenylanowa, PKA – kinaza A, PI3 – kinaza trifosforanu fosfatydyloinozytolu. PKC – kinaza C, NFkB – ang. *nuclear factor kappa-light chain-enhancer of activated B cells*, jądrowy czynnik kappa pobudzający łańcuchy lekkie aktywnych komórek B, GRB2 – białko adaptorowe, SOS – białko wymieniające guaninę.



Rycina 3.10 Schemat pokazujący zależności między populacjami komórkowymi, w których liczby komórek zwiększają/zmniejszają się poprzez zmiany stopnia proliferacji i różnicowania, dopływu komórek macierzystych oraz programowanej śmierci; wszystkie populacje podlegają procesom starzenia.

czające niekiedy proces nowotworowy. Na przykład, wirusowy onkogen *v-src* (*sarcoma*) koduje białko **p60**$^{v\text{-}src}$, które jest kinazą uruchamiającą kaskadę fosforylacji innych białek cyklu komórkowego, co doprowadza do nowotworzenia.

Przenoszone drogą płciową wirusy ludzkich brodawczaków (HPV) hamują CKI – białka p21, p27, unieczynniają p53, rozszczepiają kompleks RB/E2F oraz uczynniają geny kodujące cykliny A i E, co pobudza cykl komórkowy komórek nabłonkowych szyjki macicy, wywołując najpierw dysplazję nabłonka przechodzącą w raka *in situ*, a w końcu w raka inwazyjnego.

DNA wirusa opryszczki 8 mięsaka Kaposiego (KSHV8) koduje v-cyklinę, która w zakażonych komórkach pobudza CDK6, przechodzenie przez punkt R cyklu komórkowego i rozwój mięsaka Kaposiego – nowotworu towarzyszącego zespołowi nabytego niedoboru odporności, AIDS.

KLINIKA

Chorobami proliferacyjnymi nazywa się choroby, w których patogenezie znajdują się zaburzenia cyklu komórkowego.

Choroby nowotworowe. Główną kategorią chorób, które *par excellence* są chorobami cyklu komórkowego, są nowotwory. Komórki nowotworowe charakteryzuje łatwość przechodzenia przez punkty kontrolne cyklu komórkowego, szczególnie przez punkt restrykcyjny (przejście G1 → S). Jest to spowodowane przekształceniem protoonkogenów w onkogeny na skutek mutacji lub translokacji chromosomowej, a także hamowaniem ekspresji genów supresorowych. Wskutek tego produkty białkowe proto- i onkogenów – białka receptorów, białka szlaków transdukcji sygnałów i białka napędzające cykl komórkowy, produkowane są w nadmiarze i często pozostają w stanie permanentnej aktywacji. Produkty białkowe nieprawidłowych genów supresorowych – ***RB, TP53, INK4 i CIP/KIP,*** nie hamują cyklu komórkowego. W obu przypadkach dochodzi do niekontrolowanej proliferacji i nowotworzenia.

Choroby sercowo-naczyniowe. Miażdżyca naczyń krwionośnych oraz restenoza (ponowne zwężenie naczyń krwionośnych po ich angioplastycznym rozszerzeniu) przyczyniały się do niedawna do 50% zgonów u chorych na te choroby. Obie choroby mają swoją przyczynę w nadmiernej proliferacji miocytów gładkich. W miażdżycy mikrourazy śródbłonka wywołane ciśnieniem krwi prowadzą do powstawania przyściennych agregatów płytek krwi wydzielających cytokiny PDGF i inne. Cytokiny pobudzają proliferację miocytów gładkich i powstawanie guzków w błonie wewnętrznej naczyń, ich degenerację i wapnienie oraz przyczyniają się do powstawania pierwotnych płytek miażdżycowych. Podobny mechanizm leży u podstaw powstawania restenozy.

Produkty białkowe onkogenów mogą prowadzić także do chorób nienowotworowych, którym towarzyszą nowotwory złośliwe. W chorobie *ataxia teleangiectasia* onkogen *atm* prowadzi do powstania różnych postaci białaczek. W zespole Li-Fraumeni onkogen *TP53* daje mięsaki i guzy gruczołu sutkowego, a w przypadkach rodzinnego siatkówczaka (*retinoblastoma*) onkogen *Rb* wywołuje poza tym nowotworem także mięsaki kości. Również onkogen *IK4* kodujący p16 poza rodzinnym mięsakiem powoduje raka trzustki i złośliwiejące znamiona barwnikowe.

Starzenie tkanek

Ogólny opis starzenia

Wspólną cechą kręgowców, w tym także człowieka, jest stopniowe, postępujące z wiekiem pogarszanie procesów funkcjonalnych, zmiany strukturalne tkanek oraz ograniczenie zdolności adaptacyjnych do stresu metabolicznego, co wspólnie jest nazywane **starzeniem** (*senescentia*, ang. *aging*). W niektórych narządach i układach zmiany starcze osiągają szczególnie wysoki stopień zaawansowania, przejawiający się występowaniem **chorób towarzyszących starzeniu**. Należą do nich choroby degeneracyjne (Alzheimera, Parkinsona, miażdżyca naczyń, cukrzyca typu 2, osteoporoza, reumatoidalne zapalenie stawów i wiele innych) oraz nowotwory.

Starzenie komórek i organizmu nie jest w pełni zdefiniowanym procesem; trudno określić, czy jest ono procesem fizjologicznym czy patologicznym. Z ewolucyjnego punktu widzenia starzenie jest zjawiskiem paradoksalnym, sprzecznym z prawem doboru naturalnego. Ze statystycznego punktu widzenia starzenie jest zwiększeniem prawdopodobieństwa śmierci w miarę upływu czasu życia komórki czy organizmu. Ta definicja jest uniwersalna, obejmuje wszystkie gatunki i podkreśla postępujący charakter starzenia.

Biologiczna definicja starzenia jest bardziej skomplikowana i zawiera wiele elementów – przyczyn prowadzących do tego zjawiska:

- istnienie genetycznego programu starzenia, niestabilności genomu i roli telomerów,
- wpływ czynników zewnętrznych i wewnętrznych, prowadzących do uszkodzeń makrocząsteczek proteomu, genomu, epigenomu i lipidomu (wzrost stężenia wolnych rodników i postępująca glikacja).

Skutki tych różnorodnych przyczyn starzenia spina razem teoria **zapalenia starczego** (ang. *inflammaging*). Zakłada ona istnienie ugruntowanego ewolucyjnie, słabego i przewlekłego procesu zapalnego obejmującego z wiekiem wszystkie narządy. Prowadzi to do postępujących zmian strukturalnych, upośledzenia czynności komórek i towarzyszących im chorób wieku podeszłego – degeneracyjnych i nowotworów.

Genom i starzenie

Uniwersalizm cech starzenia u różnych gatunków może mieć swoją podstawę w istnieniu genetycznego programu starzenia. Program taki byłby częścią programu rozwoju genetycznego indywidualnego organizmu: od zapłodnienia poprzez rozwój embrionalny, osiągnięcie dojrzałości reprodukcyjnej aż do śmierci; byłby także odpowiedzialny za zaprogramowaną *a priori* długość życia organizmu. Dowody na istnienie takiego programu pochodzą z badań robaków *C. elegans*. Rozwój dorosłych robaków poprzedzają albo 4 stadia larwalne, albo gdy warunki środowiskowe są niesprzyjające, powstaje postać młodzieńcza robaka nazywana *dauer*. Robaki dorosłe żyją ok. 2 tygodni, a ich postacie *dauer* – 6 miesięcy. To wydłużenie życia można osiągnąć, mutując sztucznie jeden gen, *daf2*. Produkt genu *daf2* jest receptorem IGF1 (wiążącym m. in. insulinę), który fosforyluje i unieczynnia czynnik transkrypcji DAF16. Niefosforylowany, czynny DAF16 aktywuje ok. 100 genów, których produkty – białka szoku termicznego czy antyoksydanty – chronią komórki przed rozmaitymi rodzajami stresu, w tym stresu termicznego i oksydacyjnego, a zatem także przed starzeniem. Podobne szlaki jak insulina/IGF1 istnieją w komórkach człowieka, dając nadzieję na wydłużenie życia ludzkiego poprzez manipulacje genami. Również u myszy znaleziono gen *kl* (klotho) kodujący β-glukuronidazę. Wyłączenie tego genu (ang. *knock-out*) daje objawy przedwczesnego starzenia – progerii.

Wiele genów regulujących długość życia, starzenie i choroby mu towarzyszące koduje białka biorące udział w **reperacji DNA**. Wskazuje to na odwrotną zależność między starzeniem, nowotworami i chorobami degeneracyjnymi a efektywnością reperacji uszkodzeń DNA. Przykładem są geny i białka BRCA1 (ang. *breast cancer type 1 susceptibility protein*, białko typu 1 podatności na raka gruczołu mlekowego) oraz gen i białko HELQ (ang. *helicase, Polq-like*). BRCA1 wspólnie z innymi białkami tworzy kompleks (BASC) otaczający uszkodzenie DNA i reperuje uszkodzenie. Mutacje genu *BRCA1* upośledzają reperację DNA i prowadzą do nowotworzenia. HELQ jest helikazą biorącą udział w reperacji DNA. Jej mutacje zwiększają ryzyko raka jajnika 2-krotnie.

Wyłączanie genów kodujących ważne **hormony** jest również uważane za część programu genetycznego starzenia, chociaż samo wyłączanie genów odbywa się według mechanizmów epigenetycznych. W miarę upływu wieku organizmu geny dla hormonu wzrostu (GH) i insulinopodobnego czynnika wzrostu 1 (IGF1) wyłączane są w różnych komórkach. Prowadzi to do obniżenia stężenia tych hormonów i w konsekwencji do starczej **sarko-** i **osteopenii** oraz zaniku innych tkanek.

Mutacje DNA a starzenie

Mutacje DNA są zmianami kolejności zasad DNA i różnią się od uszkodzeń DNA będących zmianami w strukturze tego związku. Klasyfikuje się je jako: **mutacje somatyczne** (komórek somatycznych) i **mutacje genetyczne** (plemników i komórek jajowych). Ich gromadzenie uważane jest za jedną z przyczyn prowadzących do starzenia i chorób mu towarzyszących.

Dzielące się komórki popełniają błędy prowadzące do powstawania mutacji. Średnio w ludzkim organizmie dzieli się 10 komórek/s, a w $^1/_3$ spośród nich powstają mutacje DNA. Wśród mutacji znajdują się:

- mutacje punktowe, tj. zastąpienie jednego nukleotydu innym,
- insercje, tj. dodanie jednego lub więcej nukleotydów DNA,
- delecje, tj. brak jednego lub więcej nukleotydów DNA.

Efektem takich mutacji jest kodowanie przez zmutowany gen:

- białka z niezmienionym aminokwasem (mutacja milcząca),
- białka z innym aminokwasem (mutacja zmiany sensu),
- białka bez aminokwasu (mutacja nonsensowna).

Innym źródłem mutacji, poza błędami popełnianymi przez komórki, jest działanie toksyn, promieniowania jonizującego, UV i wolnych rodników. Większość mutacji jest korygowana lub niszczona poprzez śmierć całej komórki. Pozostałe kumulują się, szczególnie w komórkach rzadko się dzielących, upośledzają funkcje komórek, prowadząc do starzenia entropowego i chorób degeneracyjnych i nowotworowych.

Szczególne znaczenie mają **somatyczne mutacje mitochondrialnego DNA (mitDNA),** powstające obficie wskutek bliskości źródeł wolnych rodników oraz braku histonów mitDNA i ich ochronnego działania. Kumulujące się mutacje mtDNA, szczególnie w komórkach rzadko się dzielących, uszkadzają mitochondria, zaburzają działanie ich łańcucha oddechowego, co powoduje zwiększoną produkcję wolnych rodników, które z kolei indukują programowaną śmierć komórek i zmiany starcze. Spowalniają również metabolizm nukleotydów, co hamuje syntezę RNA oraz naraża DNA jądra na mutacje. Uszkodzone mitochondria powodują również wytworzenie wstecznego szlaku sygnałowego mitochondria → jądro, co zmienia aktywność genów i wiąże się z powstawaniem i rozwojem zmian starczych i nowotworów im towarzyszących.

Udział telomerów w starzeniu

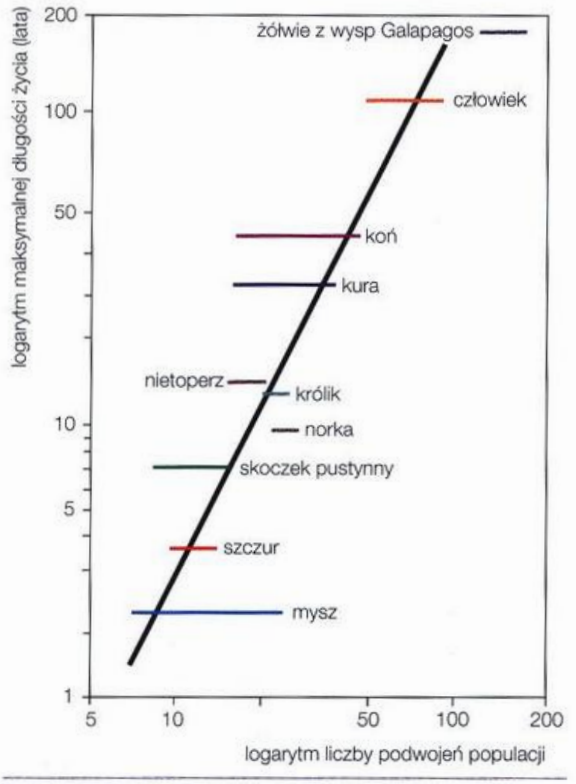
Telomery są powtarzającymi się sekwencjami nukleotydów DNA końców ramion chromosomów, tworzących rodzaj czapeczki. Chronią chromosomy, zapobiegając ich enzymatycznemu rozkładowi i fuzji ich końców. W większości komórek nie ma enzymu – telomerazy, co powoduje skracanie telomerów po każdym podziale komórki. To skracanie aż do zaniku telomeru uważane jest niekiedy za zegar biologiczny, pokazujący stopień starzenia komórek oraz czas zakończenia podziałów. Całkowity zanik telomeru jest odbierany przez komórkę jako sygnał o uszkodzeniu chromosomu i prowadzi do zahamowania cyklu komórkowego. Istnieją komórki nieśmiertelne, np. komórki zarodków preimplantacyjnych, komórki macierzyste i komórki nowotworowe zachowujące permanentną zdolność do podziałów, których telomery się nie skracają. Takie komórki mają jednak czynny enzym – telomerazę, który w każdym cyklu komórkowym syntetyzuje tracony fragment telomeru.

Ludzkie i zwierzęce komórki hodowane *in vitro* mają ograniczoną zdolność dzielenia się. Ludzkie komórki embrionalne hodowane *in vitro* po ok. 50 podwojeniach populacji przestają się dzielić, chociaż mogą jeszcze latami pozostawać żywe i pełnić swoje funkcje. Zahamowanie podziałów jest powodowane zanikiem telomerów. Taki stan komórek, które tracą lub utraciły zdolność do podziałów, nazywa się **starzeniem replikacyjnym.** Na ogół starzenie replikacyjne pozostaje w proporcji do długości życia organizmów (ryc. 3.11).

Epigenetyczne przyczyny starzenia

Starzenie entropowe jest wywoływane głębokimi zmianami **epigenomu komórki**, tj. zmianami pozagenetycznej regulacji ekspresji genów bez udziału zmian w sekwencji nukleotydów DNA.

DNA przeciętnej komórki posiada kilkadziesiąt milionów reszt cytozynowych występujących w parach cytozyna-guanina **(CG).** Cytozyna par CG może być metylowana. Jeśli metylowana jest cytozyna par CG DNA w obrębie promotora genu, wówczas ekspresja genu jest wyciszana. Pary CG występują szczególnie obficie w kilkudziesięciu tysiącach krótkich odcinków DNA nazywanych **wyspami CG,** w których są szczególnie skoncentrowane w promotorach ważnych genów. Dlatego metylacja/demetylacja CG wysp (ale także innych odcinków DNA) prowadzi do zablokowania/odblokowania transkrypcji, a zatem do **wyciszenia/aktywacji genu (ów).** Jest to jeden z trzech mechanizmów epigenetycznego wyciszania/aktywacji ekspresji genów. Innymi mechanizmami są:



Rycina 3.11 Zależność między liczbą podwojeń populacji komórek a maksymalną długością życia dawców komórek.

- zmiana kodu histonowego (acetylacja/deacetylacja, metylacja/demetylacja, ubikwitynacja i fosforylacja lizyny histonów H3 i H4), co zmienia strukturę nukleosomów i chromatyny i albo wycisza, albo włącza transkrypcję genów,
- blokowanie mRNA przez mikroRNA, co hamuje translację i wycisza geny.

Stan epigenomu trwa przez całe życie komórki i przenoszony jest wiernie poprzez mitozy, co znane jest jako ***bookmarking*** lub **pamięć komórkowa**.

W przeciwieństwie do stabilnego genomu, epigenom może być modyfikowany przez czynniki wewnętrzne i zewnętrzne, np. środowiskowe (dieta, patogeny, substancje toksyczne itp.). Epigenom zmienia się wtedy, otrzymując określone **piętna** (ang. *signatures*). Te zmiany natomiast inaktywują lub aktywują geny, a to prowadzi do starzenia i powstawania chorób towarzyszących starzeniu.

Zmiana stanu metylacji DNA z wiekiem

Epigenom zmienia się z wiekiem. Od zapłodnienia do stadium blastocysty następuje wymazywanie (resetowanie) metylacji miejsc cytozynowych DNA. Podobny proces występuje także w spermato- i oogenezie, a jego następstwem jest odbudowa **imprintingu,** tj. wyciszenia ekspresji alleli ok. 100 genów albo matczynych, albo ojcowskich.

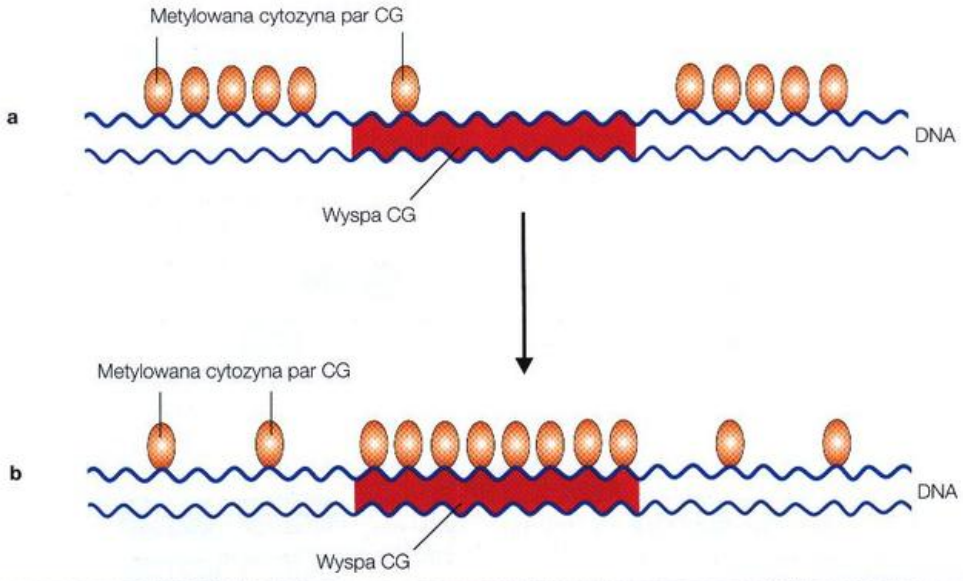
W komórkach węzła zarodkowego blastocysty rozpoczyna się odbudowa stanu epigenetycznego w postaci metylacji cytozyny DNA, czyli różnicowanie komórkowe, którego apogeum przypada na okres okołoporodowy, kiedy 81% miejsc cytozynowych DNA jest zmetylowanych. W życiu po urodzeniu dochodzi do postępującej **hipometylacji DNA** – u ludzi 26-letnich 78% miejsc cytozynowych jest zmetylowanych, a u starców tylko 73%.

U ludzi starzejących się, jednocześnie z ogólną hipometylacją pojawia się (ryc. 3.12) **hipermetylacja wysp CG,** co prowadzi do wyciszania genów, których promotory znajdują się w obrębie wysp. Dlatego wiele komórek ludzi starzejących się traci zdolność ekspresji genów dla białka p53, PCG (reguluje biogenezę mitochondriów, wytwarzanie ATP i metabolizm), dysmutazy nadtlenkowej (jeden z antyoksydantów), dla syntazy NO (prowadzi to do nadciśnienia krwi), lipooksygenazy (zaostrza procesy zapalenia starczego) i wielu innych. Transkrypcja wielu innych genów dla białek napędzających i regulujących cykl komórkowy jest w starzejących się komórkach zablokowana (ryc. 3.13).

Manipulowanie donorami grup metylowych, np. S-adenylometioniną (SAM), przyspiesza lub opóźnia metylację cytozyny DNA, przyspieszając lub opóźniając proces starzenia oraz skracając lub wydłużając życie.

Deacetylacja i starzenie

Deacetylacja histonów jest, poza metylacją DNA i histonów, innym, epigenetycznym mechanizmem wyłączania aktywności genów. W komórkach ludzkich istnieje 7 rodzajów deacetylaz, nazywanych **sirtuinami (SIRT1-7),** należących do rodziny białek HDAC, które są, obok kinazy mTOR, czujnikami stanu energetycznego komórki i jej zaopatrzenia w substancje odżywcze. Działanie różnych sirtuin może być różne i zależy także od hydrofobowych składników ich substratów. Deacetylacja histonów H3 i H4 przez SIRT wiąże je ściśle z DNA, blokując dostęp czynników i koaktywatorów transkrypcji do genów i inaktywując (wyciszając) te geny. Substratami dla sirtuin, poza histonami, są także **białko p53, RB, białko PCG, NFkB** i inne, których deacetylacja zmienia ich czynność. Silnym aktywatorem SIRT1 i SIRT5 jest polifenol **resweratrol,** znajdujący się w czerwonym winie. Resweratrol daje tzw. francuski



Rycina 3.12 Symboliczne przedstawienie zmian ogólnej liczby par CG DNA w komórce, których cytozyna może ulegać metylacji/demetylacji w czasie życia człowieka po urodzeniu. Od urodzenia (**a**) do wieku starczego (**b**) ogólna ilość zmetylowanej cytozyny par CG zmniejsza się (hipometylacja). Natomiast w wieku dojrzałym i starczym zwiększa się hipermetylacja cytozyny w wyspach CG. Ponieważ w wyspach CG jest dużo par CG w promotorach ważnych genów, metylacja ich cytozyny prowadzi do wyciszenia ekspresji tych genów.

paradoks: stosunkowo długie życie, mimo tłustej i wysokokalorycznej diety z jednoczesnym spożywaniem dużej ilości czerwonego wina. Inhibitory sirtuityny, np. splitomycyna, stosowane są w modyfikowaniu starzenia, w leczeniu towarzyszących starzeniu chorób degeneracyjnych i nowotworach oraz w otyłości.

MikroRNA i starzenie

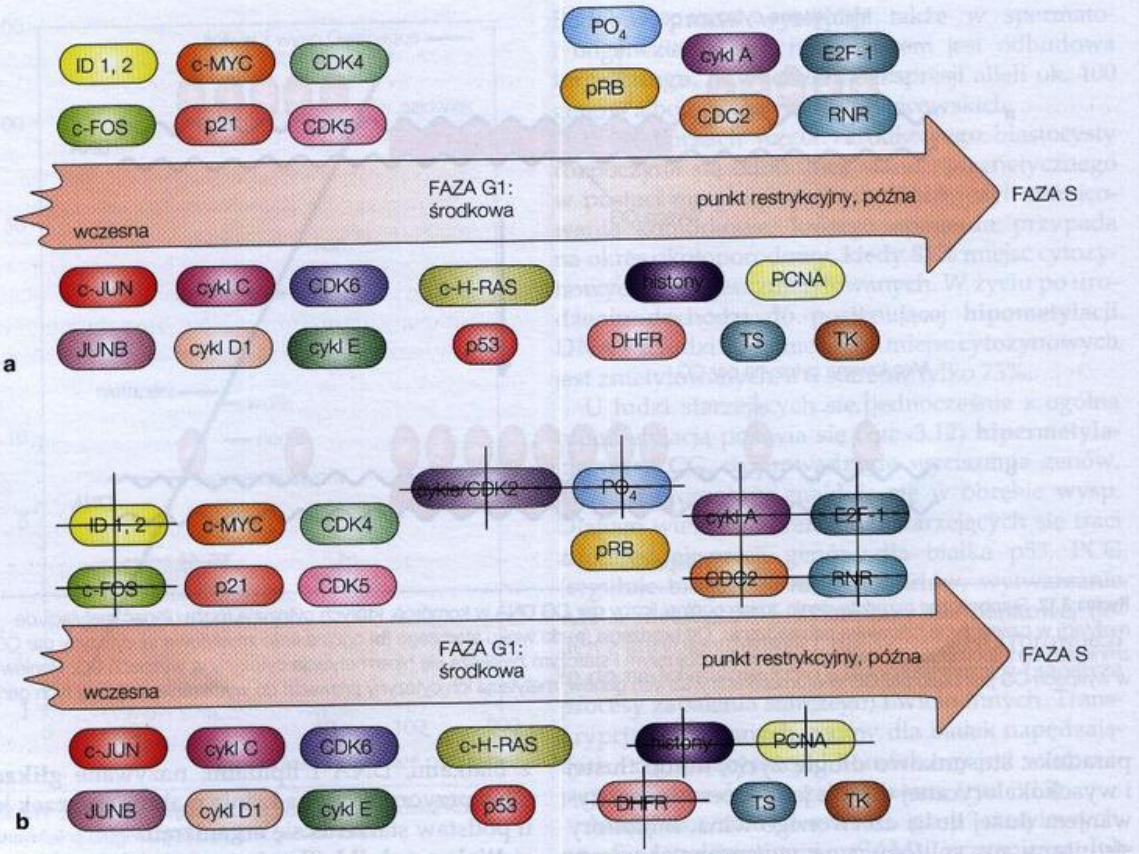
MikroRNA jest małą niekodującą cząsteczką RNA, która reguluje negatywnie potranskrypcyjną ekspresję genów, działając blokująco na mRNA, a zatem także na translację. Obok metylacji DNA i modyfikacji histonów należy do maszynerii białkowej epigenomu. Każdy rodzaj mikroRNA kontroluje ekspresję 100 genów. Spośród 600 rodzajów mikroRNA zbadanych w mózgu 15% zmienia swoją aktywność w czasie starzenia.

Wolne rodniki i glikacja: uszkodzenia makrocząsteczek

Uszkodzenia cząsteczek i makrocząsteczek mają szczególne znaczenie w powstawaniu i narastaniu zmian starczych w komórkach i istocie międzykomórkowej. Jedną z głównych przyczyn takich uszkodzeń jest wzrastające z wiekiem stężenie **wolnych rodników (stres oksydacyjny).** Inną przyczyną jest niekontrolowane wiązanie cukrów z białkami, DNA i lipidami, nazywane **glikacją.** Obie przyczyny uszkadzania makrocząsteczek leżą u podstaw starzenia się organizmu.

Wolne rodniki. Tlen jest potencjalnie toksyczny i chociaż jest niezbędny do życia komórek organizmów tlenowych, ujawnia także swoje szkodliwe działanie. Ok. 2% tlenu zużywanego przez komórki ulega redukcji poprzez dodawanie elektronów. Prowadzi to do powstawania wolnego rodnika – anionu nadtlenkowego (O_2^-), a z niego wielu innych rodników – rodnika hydroksylowego (OH^-), nadtlenku wodoru (H_2O_2) i innych. Wolne rodniki, które mają niesparowane elektrony, wchodzą łatwo w reakcje z białkami, lipidami i kwasami nukleinowymi jąder, mitochondriów, błon i innych składników komórek. Wynikiem tych reakcji jest karbonylacja białek (powstawanie grup C=O) i utlenianie ich grup SH, początkowanie peroksydacji nienasyconych kwasów tłuszczowych błon oraz zmiany w cząsteczkach DNA: przerywanie pojedynczych nici i podwójnej helisy, zamiany par zasad, wymiany fragmentów chromatyd oraz wytwarzanie krzyżowych wiązań DNA-białka.

Dziennie do **200 tys. wolnych rodników** oddziałuje na DNA jednej komórki, powodując jego uszkodzenia. Stężenie wolnych rodników w tkankach oraz natężenie czynionych przez nie uszkodzeń zwiększa się z wiekiem i jest 2–3 razy większe



Rycina 3.13 Białka napędzające i regulujące przechodzenie ludzkich fibroblastów: **a.** ludzi młodych; **b.** ludzi starych, przez wczesną, środkową i późną fazę G1 do fazy S cyklu komórkowego. Cykl – cykliny, CDK – cyklazy zależne od cyklin, RNR – reduktaza rybonukleotydowa, DHFR – reduktaza dihydrofolianowa, PCNA – antygen komórek proliferujących, TS — synteza tymidylanowa, TK – kinaza tymidyny, ID1,2 – inhibitory wiązania DNA, *FOS, MYC, JUN, RAS* – czynniki transkrypcji, pRB – białko RB. Przekreślenie białka oznacza brak jego aktywności w komórkach starych (zmodyfikowano wg J. Smitha i O. Pereira-Smith).

w komórkach osób w zaawansowanym wieku niż u osób młodych.

Regulacyjna rola wolnych rodników. Wolne rodniki w stężeniu subtoksycznym pełnią jednak także dobrotliwe funkcje informatorów wewnątrzkomórkowych. Kontrolują wówczas czynniki transkrypcji i transkrypcję oraz regulują aktywność kinaz i fosfataz. Działają także na białka bogate w cysteinę, np. na kinazę MAP, wytwarzając wiązania S-S i zmieniając jej konformację i aktywność. Regulują również metylację cytozyny DNA, modyfikując epigenom. Nadmierna produkcja wolnych rodników u ludzi starzejących się zaburza regulującą, dobrotliwą rolę wolnych rodników, przyspieszając starzenie.

Antyoksydanty. W normalnych warunkach i u ludzi młodych wolne rodniki są sprawnie neutralizowane przez **antyoksydanty**, do których należą enzymy: dysmutaza nadtlenkowa (SOD), katalaza, peroksydaza glutationu (GPx), peroksyredoksyna 1 (PRX1), a także wiele związków chemicznych: β-karoten, foliany, kwas moczowy, witaminy A, C, E i inne. Z wiekiem zmniejsza się aktywność i ilość antyoksydantów, co obok zwiększenia produkcji wolnych rodników, prowadzi do nadmiaru tych ostatnich w tkankach. Jest to powodem uszkodzeń komórek i istoty międzykomórkowej, postępującego starzenia oraz chorób mu towarzyszących.

Glikacja, obok wolnych rodników, jest głównym źródłem upośledzenia funkcji makrocząsteczek genomu, epigenomu, proteomu i lipidomu prowadzącego do osłabienia aktywności makrocząsteczek, starzenia entropowego i skrócenia życia.

Glikacja jest nieenzymatyczną glikozylacją, tj. niekontrolowanym, spontanicznym dodawaniem do cząsteczek białek, DNA i lipidów, cząsteczek cukru – glukozy, fruktozy, deoksyrybozy, rybozy i in.

Glikacja postępuje powoli, upośledzając aktywność i funkcjonowanie makrocząsteczek. Szczególnie intensywna glikacja występuje w cukrzycy, w której podwyższone jest stężenie glukozy.

Glikacja zewnętrzna i wewnętrzna. Glikacja zewnętrzna (poza organizmem człowieka) występuje w czasie przygotowania posiłków, kiedy cukry, białka, DNA i lipidy zawarte w pożywieniu są poddawane działaniu wysokiej temperatury. Powoduje to brązowienie mięsa i glikację makrocząsteczek, nazywane reakcją Maillarda. Natomiast **glikacja wewnętrzna** zachodzi powoli i spontanicznie w organizmie człowieka: w komórkach i w istocie międzykomórkowej. Cukry wiążą się z grupami aminowymi i tiolowymi argininy, lizyny i cysteiny białek, z deoksyguanozyną DNA lub fosfolipidami.

Etapy rozwoju glikacji. Glikacja przebiega w kilku etapach: cukry wiążą się z grupami NH_4 i SH makrocząsteczek, wytwarzając **przejściowe produkty glikacji** – zasadę Schiffa, i produkt Amadoriego. Ten ostatni przekształca się w **zaawansowane, końcowe produkty glikacji, AGE** (ang. *advanced glycation endproducts*), które w większości są związkami α, β-dikarbonylowymi, jak np. metyloglioksal lub glioksal. Naturalnym enzymem rozkładającym takie związki jest **glioksalaza 1,** której aktywność spada w miarę starzenia organizmu.

Rodzaje AGE. Mogą one występować w postaci dużych, połączonych wiązaniami krzyżowymi agregatów w różnych tkankach, odpowiadając za zaburzenia ich funkcji. Większość AGE białkowych zawiera strukturę arginina-lizyna-glukoza (nazywaną glukozepanem). Ten typ wiązań krzyżowych dominuje i jest go 50 razy więcej u starców 90-letnich niż innych typów wiązań krzyżowych u ludzi w średnim wieku oraz 2 razy więcej u chorych na cukrzycę niż u zdrowych ludzi. Wiązania krzyżowe są odporne na proteolizę i dlatego endoproteazy tkankowe nie rozkładają ich. Głównym źródłem AGE występujących w organizmie człowieka jest glikacja wewnętrzna, która nasila się począwszy od 35 r. ż. Na powierzchni wielu komórek znajdują się receptory dla AGE – **RAGE,** których liczba wzrasta z wiekiem oraz w cukrzycy i chorobach degeneracyjnych. Związanie AGE z RAGE prowadzi do:

- endocytozy AGE i ich zalegania w komórkach albo trawienia przez układ lizosomów,
- pobudzenia aktywności NFkB i rozwoju zapalenia starczego.

Na glikację są głównie narażone białka długo żyjące, np. kolagen, krystalina soczewki oka czy białka błon podstawnych. Na przykład, AGE kolagenu skóry zmieniają jej biologiczne i fizyczne właściwości, powodując utratę elastyczności i zwiotczenie, co prowadzi do pojawienia się zmarszczek i cellulitu. AGE krystaliny powoduje mętnienie soczewki oka i pogorszenie ostrości widzenia (katarakta). AGE błon podstawowych pogarsza ukrwienie i funkcjonowanie nerki (nefropatia) i innych narządów. AGE tkanki nerwowej mózgowia wytwarzają w chorobie Parkinsona ciałka Lewy'ego w neuronach istoty czarnej lub płytki β-amyloidu w chorobie Alzheimera.

Glikacja hemoglobiny. Globina hemoglobiny wiąże glukozę krwi, wytwarzając **glikacjowaną hemoglobinę (HbA1c).** Im więcej jest glukozy we krwi, tym proporcjonalnie więcej powstaje HbA1c. Zatem określenie stężenia HbA1c wskazuje, jakie było średnie stężenie glukozy w ciągu ostatnich 8–12 tygodni (czas życia erytrocytów). Ludzie niechorujący na cukrzycę mają 3,5–5,5% HbA1c.

Glikacja DNA, poprzez wiązanie cukrów z deoksyguanozyną, powoduje przede wszystkim wzrost mutacji oraz reperacji tego związku. AGE DNA znaleziono w komórkach osób chorych na nefropatię i w cukrzycy typu 2.

Glikacja lipidów dotyczy zarówno białek, jak i cholesterolu LDL. AGE-cholesterol LDL-u zwiększa drastycznie utlenianie LDL zachodzące w ogniskach miażdżycy. AGE-białka LDL-u znoszą powinowactwo LDL do jego komórkowych receptorów, hamując jego endocytozę i podnosząc jego stężenie we krwi.

Rola uszkodzeń DNA

W miarę upływu wieku organizmu zwiększa się stopień uszkodzeń DNA, tj. zmian jego struktury, jak przerwanie ciągłości, brak zasady lub zasad DNA albo chemiczna ich zmiana. Stężenia wolnych rodników oraz końcowych produktów glikacji (AGE) w tkankach przyczyniają się najczęściej do uszkodzeń DNA, które ze względu na ich częstość i konsekwencje są ważną przyczyną rozwoju zmian starczych i chorób im towarzyszących – degeneracyjnych i nowotworów. Wolne rodniki oraz AGE uszkadzają jądrowe DNA, a w jeszcze większym stopniu – mitochondrialne DNA (mtDNA).

DNA jądrowy. Wolne rodniki (ale także inne czynniki) uszkadzają jądrowy DNA w tempie 60 tys. uszkodzeń/dzień. Najczęstszymi uszkodzeniami są pęknięcia pojedynczych nici DNA (50 tys./dzień), depurynacja (10 tys./dzień), alkilacja zasad (2 tys./dzień), a następnie w kolejności deaminacja, wiązania krzyżowe i pęknięcie obu nici DNA. Średnia liczba uszkodzeń DNA jądrowego na 1 komórkę i na 1 godzinę wynosi – 2,5 tys.

Większość tych uszkodzeń jest reperowana z użyciem maszynerii reperacji DNA. Wiele genów regulujących długość życia, starzenie i choroby mu towarzyszące koduje białka biorące udział w **reperacji DNA**. Szeroko znanym przykładem jest gen i białko BRCA1 (ang. *breast cancer type 1 susceptibility protein*, białko typu 1 podatności na raka gruczołu mlekowego). BRCA1 wspólnie z innymi białkami tworzy kompleks (BASC) otaczający uszkodzenie DNA, np. pęknięcie obu jego nici, i reperuje uszkodzenie. Natomiast mutacje genu *BRCA1* upośledzają reperację DNA i prowadzą do nowotworzenia – choroby towarzyszącej starzeniu.

Część uszkodzeń DNA pozostaje **niezreperowana.** Los tych niezreperowanych uszkodzeń jest różny w zależności od tego, czy komórki się dzielą często, czy też rzadko lub wcale. W komórkach dzielących się często (nabłonki, komórki szpiku itp.) niezreperowane uszkodzenia prowadzą albo do **śmierci komórek** i w ten sposób niszczenia uszkodzeń DNA, albo po kilku podziałach przekształcają się w **mutacje**, które niekiedy wywołują nowotworzenie. Natomiast w komórkach niedzielących się lub rzadko się dzielących (mózg, serce, mięsień szkieletowy, nerka, wątroba, kość czy długo żyjące komórki macierzyste) niezreperowane **uszkodzenia DNA kumulują się z wiekiem**. Powoduje to stopniowe upośledzenie funkcji, obniżenie ekspresji genów oraz śmierć licznych komórek, czyli objawy narastającego starzenia entropowego.

DNA mitochondrialny (mtDNA). Jest kolistym DNA występującym w mitochondrium w kilkuset kopiach. Koduje 13 białek i 24 rodzaje RNA. Uszkodzenia mtDNA są słabo reperowane, a wobec braku ochronnej roli histonów i wobec bliskości źródeł wolnych rodników powstających głównie w mitochondriach, występują 10–20 razy częściej niż w jądrowym DNA.

Ograniczenie kaloryczne. Peroksyredoksyna 1

Ograniczenie kaloryczne, tj. ograniczenie zużycia kalorii (bez stwarzania warunków niedożywienia), jest uważane za ważny czynnik powstrzymujący starzenie i przedłużający życie. U myszy i szczurów skutki ograniczenia kalorycznego są poprzedzane pojawianiem się cech sprzyjających wydłużeniu życia: obniżenie stężenia glukozy, insuliny i trijodotyroniny we krwi, zwiększenie czułości komórek na insulinę, obniżenie temperatury, polepszenie reperacji DNA, zwiększenie częstości apoptoz oraz opóźnienie zmian starczych w układzie nerwowym i wewnątrzwydzielniczym. Ograniczenie kaloryczne prowadzi ponadto do zmniejszenia wytwarzania wolnych rodników, a przez to do zmniejszenia stopnia uszkodzeń DNA, karbonylacji białek i utleniania nienasyconych kwasów tłuszczowych. Dzięki temu reperacja DNA jest sprawniejsza, wiele enzymów zachowuje aktywność, a błony stają się bardziej płynne. To wszystko wydłuża życie o 20%.

Enzymem odpowiedzialnym za dobrotliwe efekty ograniczenia kalorycznego jest **peroksyredoksyna 1, Prx1**, która jest antyoksydantem rozkładającym nadtlenek wodoru. Jednak w miarę upływu wieku organizmu Prx1 traci aktywność. W komórkach istnieje jednak inny enzym **sulfiredoksyna 1, Sxr1,** który redukując cysteinę unieczynnionego Prx1 przywraca enzymowi aktywność, opóźnia starzenie oraz wydłuża życie.

Rola zapalenia starczego

Zapalenie (inflammatio, ang. *inflammation*) jest obronną reakcją na czynniki szkodliwe, szczególnie patogeny. Proces zapalny usuwa jego przyczyny oraz reperuje uszkodzenia, będące ich skutkiem. Natomiast **zapalenie starcze** (ang. *inflammaging*) jest ukształtowanym ewolucyjnie, przewlekłym zapaleniem o słabym nasileniu występującym u ludzi starzejących się. Wobec utrzymujących się przyczyn zapalenia i niesprawności mechanizmów obronnych, zapalenie starcze charakteryzuje przewaga procesów uszkadzających nad procesami reparacyjnymi.

Dzięki sprawnym mechanizmom zapalenia/odporności wrodzonej ludzie pierwotni mieli szansę dożyć do okresu pokwitania i reprodukować się. Niezgodne z planami ewolucji wydłużenie życia ludzkiego sprawiło, że dobrotliwe skutki zapalenia przekształcają się z wiekiem człowieka w skutki uszkadzające komórki i istotę międzykomórkową, prowadzące do starzenia entropowego.

Na powierzchni i w cytoplazmie wielu komórek znajdują się **czujniki – receptory PRR** (ang. *pattern recognition receptors*). Te czujniki—receptory są białkami transbłonowymi lub białkami rozpuszczalnymi, pływającymi w cytoplazmie. Rozpoznają one budowę **cząsteczek patogenów** (**PAMP**, ang. *pathogen-associated molecular pattern*) wirusów, bakterii, grzybów i innych drobnoustrojów oraz własnych cząsteczek zmienionych przez stres (**SAMP**, ang. *stress-associated molecular pattern*, ryc. 3.15) i potrafią odróżnić je od normalnych cząsteczek organizmu gospodarza. Najlepiej poznanymi receptorami PRR są białka transbłonowe – **TLR** (ang. *Toll-like receptor*) oraz białka pływające w cytoplazmie – **NLR** (ang. *NOD-like receptor*) i **RLH** (ang. *RIG-like helicase*). W obecności PAMP i SAMP białko NLRP1 (lub

inne receptory PRR) tworzą kompleksy nazywane **inflammasomami,** które aktywują proteazę – kaspazę 1, prowadząc do aktywacji prozapalnych cytokin IL1 i IL18 oraz wydzielania interferonu γ, a następnie IL6, TNF-α oraz chemokin. Inflammasomy aktywują także limfocyty NK. Cytokiny wyzwalają wiele prozapalnych reakcji komórek, a interleukina 6 wpływa na hepatocyty wątroby wydzielające wtedy cytokinę – **białko C-reaktywne (CRP)** – molekularny znacznik toczącego się procesu zapalnego. CRP jest ważnym czynnikiem ryzyka w zawale serca i cukrzycy typu 2, wskazującym na zapalną proweniencję obu tych chorób, wiążących się ze starzeniem.

Zapalenie starcze jest **przestrojeniem odporności wrodzonej i nabytej.** W odporności wrodzonej z wiekiem makrofagi mają mniejszą zdolność do fagocytozy i produkcji MHC II. Neutrofile mniej fagocytują i produkują mniej wolnych rodników. Komórki dendrytyczne mają mniejszą zdolność fagocytozy komórek apoptotycznych i migracji. Zmniejsza się cytotoksyczność limfocytów NK. W odporności nabytej zmniejsza się ogólna aktywność i liczba limfocytów T. Dzieje się tak dlatego, że aktywność cyklooksygenaz (COX) wzrasta z wiekiem, podobnie jak synteza prostaglandyn, które hamują proliferację limfocytów T, zmniejszając ich liczbę z wiekiem. Następuje zanik grasicy, a repertuar receptorów limfocytów T (receptory α, β, γ, δ, z których każdy występuje w postaci dziesiątków tysięcy do milionów subtypów) zmniejsza się drastycznie po 70 r. ż. Wzrasta produkcja cytokin prozapalnych i spada produkcja IL2. Wzrasta natomiast liczba limfocytów T pamięci i produkcja IL4 i IL10, a spada liczba limfocytów B opuszczających szpik kostny. Obniża się reaktywność przeciwciał w stosunku do szczepionek.

Narastająca w ciągu życia ekspozycja na patogeny chorób zakaźnych oraz na nieprawidłowe własne cząsteczki przyspiesza starzenie układu immunologicznego, a później wszystkich układów. Niekiedy narastające starzenie entropowe niektórych narządów/układów przyjmuje postać chorób, będących skutkiem starzenia – nowotworów, chorób sercowo-naczyniowych, przewlekłych chorób zapalnych, chorób neurologicznych, chorób metabolicznych, zapalenia stawów i kości, dystrofii mięśniowej, zespołu przewlekłego zmęczenia oraz zmian skórnych (ryc. 3.14).

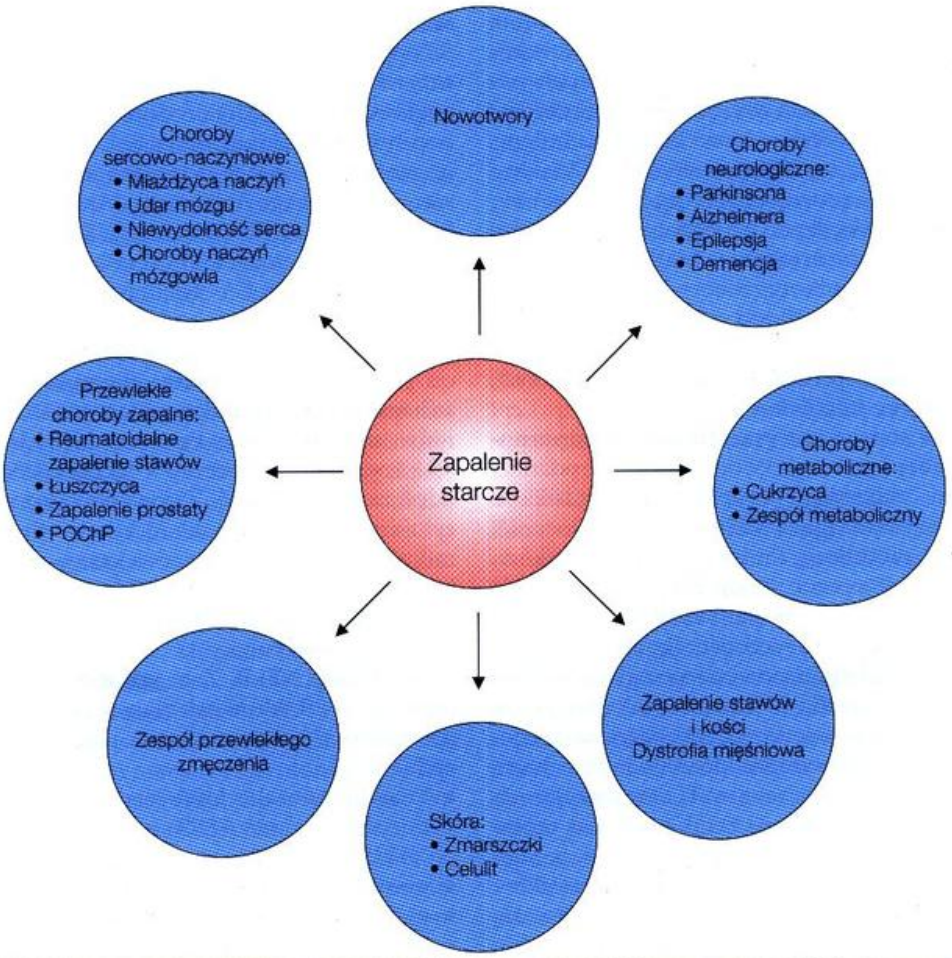
Kluczowa rola NFkB w zapaleniu starczym (ryc. 3.15). Wiele czynników biorących udział w rozwijaniu zapalenia/odporności wrodzonej działa poprzez **czynnik transkrypcji NFkB** (ang. *nuclear factor kappa-light chain-enhancer of activated B cells*, jądrowy czynnik kappa pobudzający łańcuchy lekkie aktywnych komórek B) i jego szlaki transdukcji sygnałów. NFkB jest heterodimerem składającym się z różnych kombinacji białek Rel. W normalnych warunkach NFkB jest w cytoplazmie związany z białkiem IkB, które go inaktywuje. Aktywacja NFkB, m. in. przez kinazę IKK, powoduje jego transport (lub jego składowych białek) do jądra, gdzie wspólnie z koaktywatorami i polimerazą RNA wzbudza i przeprowadza transkrypcję. Efektem aktywacji NFkB jest przede wszystkim aktywacja i transkrypcja **prozapalnych cytokin, chemokin, cząsteczek adhezyjnych, cyklooksygenaz (COX) eikosanoidów, metaloproteaz, synatazy NO i innych.** Należą one do mechanizmów włączających zapalenie/odporność wrodzoną. Z wiekiem wzrasta stężenie cytokin prozapalnych, co indukuje odpowiedź komórek na stres w postaci zwiększonego uwalniania kortyzolu. Rola przeciwzapalna kortyzolu objawia się na obwodzie, a w korze mózgu i hipokampie działa on prozapalnie.

Inhibitory NFkB. Znanych jest ponad 700 inhibitorów NFkB, które osłabiają reakcje zapalne oraz spowolniają proces starzenia. Znajdują się wśród nich:

- kwas acetylosalicylowy (aspiryna), który blokuje miejsce wiązania ATP w kinazie IKK aktywującej NFkB,
- niesteroidowe leki przeciwzapalne,
- glukokortykoidy zatrzymujące NFkB w cytoplazmie,
- antyoksydanty,
- inhibitory proteasomów rozkładających IkB,
- statyny (inhibitory reduktazy HMG acetylokoenzymu A),
- polifenole roślinne blokujące aktywność kinazy IKK,
- rekombinowane peptydy, blokujące interakcje białka-białka i zatrzymujące NFkB w cytoplazmie.

Wysiłek fizyczny spowalnia proces starzenia, działając głównie przeciwzapalnie. Efektem skurczów mięśni szkieletowych jest wydzielanie przez nie dużych ilości IL6 (niezależnie od TNF-α), która działa hamująco na TNF-α i CRP, osłabia zapalenie starcze i powstrzymuje rozwój starzenia.

W czasie **snu** obniża się wydzielanie TNF-α i niemięśniowej IL6, a podwyższenie stężenia tych cytokin daje uczucie senności, wyczerpania i zmęczenia. Dlatego w stanach starczych zaburzeń snu stosuje się steroidy płciowe pobudzające cytokiny prozapalne.



Rycina 3.14 Diagram pokazujący najczęstsze choroby powstające jako wynik zapalenia starczego i starzenia.

Statyny – inhibitory reduktazy HMG acetylokoenzymu A, stosowane masowo w celu obniżenia stężenia LDL we krwi, wywierają również dobrotliwy efekt hamowania rozwoju zapalenia starczego.

mTOR w zapaleniu starczym

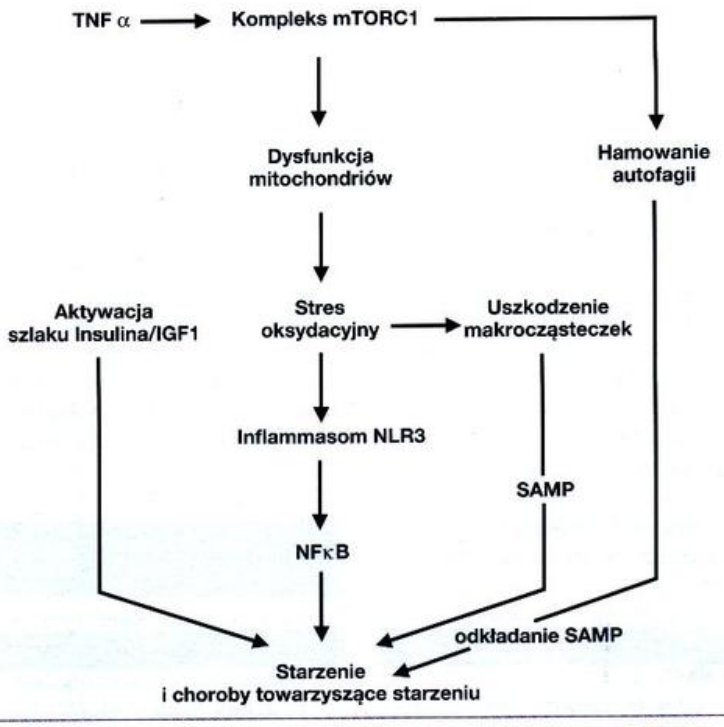
W obecności NFkB cytokina prozapalna TNF-α aktywuje ważne białko **mTOR** (ang. *mammalian target of rapamycin*, wiązanie rapamycyny u ssaków), które wtedy **hamuje autofagię**. Doprowadza to do gromadzenia uszkodzonych i zużytych cząsteczek (SAMP), uszkodzenia mitochondriów i zaburzenia energetyki komórek oraz metabolizmu (ryc. 3.15).

Natomiast przy nieaktywnym NFkB TNF-α stymuluje ekspresję białka Beclin1, które aktywuje proces autofagii.

mTOR są ważnymi kinazami integrującymi sygnały o dostępności cytokin, substancji odżywczych (np. aminokwasów, kwasów tłuszczowych itp.) oraz energii (ATP). Regulują także syntezę białka i autofagię. Włączają cykl komórkowy, jeśli warunki są sprzyjające, a jeśli nie są (np. w stresie), uruchamiają katabolizm, nie włączając cyklu. Hamowanie ich aktywności spowalnia proces starzenia, wydłuża życie i odmładza tkanki. Szlak mTOR moduluje przebieg licznych chorób powstających jako wynik starzenia – choroby Alzheimera, nowotworów, chorób serca i nerek oraz chorób autoimmunizacyjnych. Hamowanie mTOR, np. przez rapamycynę, powoduje wyraźne spowolnienie rozwoju tych chorób.

Podwzgórze a starzenie

Podwzgórze jest centralnym narządem regulującym nastrój, przyjmowanie pożywienia, strach, reprodukcję i czas biologiczny, a ostatnio udowod-



Rycina 3.15 Schemat pokazujący szlak aktywacji kinazy kompleksu mTORC1 i czynnika transkrypcji NFkB w procesie powstawania zapalenia starczego i chorób towarzyszących starzeniu. Cytokina prozapalna TNF-α (i inne czynniki) indukuje kinazę kompleksu mTORC1, co prowadzi do dysfunkcji mitochondriów, stresu oksydacyjnego (wolne rodniki), uszkodzeń makrocząsteczek DNA, białek i lipidów oraz hamowania autofagii. Wolne rodniki aktywują NLR3 (jeden z receptorów PRR) inflammasomu, a ten indukuje NFkB, co inicjuje i przyspiesza rozwój zmian starczych. Wolne rodniki i glikacja (nie została pokazana) produkują SAMP (stresowo zmienione cząsteczki). Wobec hamowania autofagii przez mTORC1, SAMP odkładają się w komórkach i istocie międzykomórkowej, prowadząc do starczego upośledzenia czynności tkanek oraz powstawania chorób degeneracyjnych. Ponadto stres oksydacyjny wywołuje mutacje i nowotworzenie. Aktywacja szlaku przekazywania sygnałów GH/IGF1 (hormon wzrostu/insulinopodobny czynnik wzrostu 1) dodatkowo przyspiesza proces starzenia.

niono, że reguluje także starzenie. W komórkach nerwowych jego jąder ilość NFkB zmienia się drastycznie z wiekiem: najwięcej jest go u starych myszy, mniej u myszy w średnim wieku i prawie wcale nie ma go u młodych zwierząt. Hamowanie NFkB podwzgórza poprzez inaktywację kinazy IKK-β wydłuża życie myszy o 20%. Wpływ NFkB na starzenie odbywa się poprzez hormon podwzgórza uwalniający gonadotropinę (GnRH), a podanie GnRH spowalnia proces starzenia. Podwzgórze zatem spełnia rolę programowania procesów starzenia za pośrednictwem układu immuno-neuro-endokrynologicznego.

KLINIKA

Zespoły przedwczesnego starzenia (progerie). Progerie są wrodzonymi chorobami ujawniającymi się w dzieciństwie, których objawy przypominają obraz starzejącego się organizmu. Do objawów takich należą: skrócenie ciała, siwienie włosów, zmarszczki oraz zanik skóry, tkanki podskórnej i mięśni (sarkopenia), a także zmniejszenie masy kości (osteopenia). Osoby dotknięte progeriami są ponadto oporne na insulinę, wykazują hiperlipidemię, nieprawidłowy kolagen i podwyższony metabolizm. Rozwijają się u nich: miażdżyca, osteoporoza, zaćma oraz nowotwory złośliwe. Do progerii zalicza się: zespół Wernera, zespół Hutchinsona-Gilforda, zespół Cockayne'a i zespół Downa.

Zespół Wernera jest autosomalną, recesywną anomalią występującą w Japonii i na Sardynii 1:20–40 tys. urodzeń, a w innych częściach świata 1:100 tys. Charakteryzuje się zahamowaniem wzrostu, przedwczesnym siwieniem i łysieniem, zmarszczkami, zanikiem skóry i tkanki tłuszczowej, zaćmą, przedwczesną miażdżycą, cukrzycą typu 2 i osteoporozą. Przyczyną jest mutacja genu *WRN* kodującego helikazę oraz wtórne mutacje prowadzące do zaburzeń podwajania genomu, nadmiernego skracania telomerów i in. Śmierć następuje przed 50 r.ż.

Zespół Hutchinsona-Gilforda jest rzadką anomalią występującą 1:8 milionów urodzeń. Obserwuje się tu wszystkie objawy przedwczesnego starzenia. Chorzy umierają w dzieciństwie lub wczesnej młodości. Przyczyną jest punktowa mutacja genu *LMNA*, którego cytozyna w pozycji 1824 jest zamieniona na tyminę. Gen *LMNA* koduje prelaminę A z dołączoną do niej grupą farnesylową – składnikiem blaszki jądrowej. Normalnie grupa farnesylowa jest usuwana, natomiast w zespole Hutchinsona-Gilforda pozostaje związana z laminą, tworząc białko – *progerynę*, które łączy się z blaszką jądrową, rozwijając progerię. Inne mutacje genu *LMNA* prowadzą do miopatii, choroby Charcota-Marie'a-Toothа typu 2 oraz lipodystrofii rodzinnej.

Zespół Cocknaye'a powstaje na skutek mutacji genu *csB*, który koduje rodzinę ATP-az – SW12. Występują tutaj także zaburzenia reperacji DNA. Poza charakterystycznymi objawami przedwczesnego starzenia osoby dotknięte tą chorobą wykazują nadwrażliwość na światło, degenerację układu nerwowego i niedorozwój gonad. Ludzie dotknięci chorobą nie przeżywają 40 r.ż.

Zespół Downa jest wywoływany trisomią chromosomów 21 i chociaż ludzie dotknięci chorobą dożywają 70 r.ż., to jednak występuje u nich wiele objawów wczesnego starzenia. Cierpią ponadto na chorobę Alzheimera, białaczki i cukrzycę.

Piśmiennictwo

Ciszak L., Wołowiec D., Kosmaczewska A., Boćko D., Frydecka I.: *Białko p27: Budowa, funkcje biologiczne oraz udział w patomechanizmie procesów rozrostowych.* Post. Biol. Kom. 2000, 27, 481.

Ciszak L., Wołowiec D., Kosmaczewska A., Boćko D., Frydecka I.: *Białkowe inhibitory kinaz cyklinozależnych z rodziny p16: Budowa, właściwości biologiczne i rola biologiczna.* Post. Biol. Kom. 1999, 26, 539.

Czepulis N., Wieczorkowska-Tobis K.: *Interleukin 6 and longevity.* J. Med. Sci. 2013, 1(82), 97.

Franceschi C., Campisi J.: *Chronic inflammation (inflammaging) and its petential contribution to age-associated diseases.* J. Gerontol. A. Biol Sci. Med. Sci. 2014, 69, S4.

Kwiatkowska D., Kwiatkowska-Korczak J.: *Kwas retinowy, jego metabolizm i mechanizmm działania.* Post. Biol. Kom. 1999, 26, 579.

Malumbres C., Barbacid M.: *Cell cycle, CDK and cancer a changing paradigm.* Nature Reviews Cancer, 2009, 9, 153.

Myśliwski A., Kmieć Z.: *Starzenie się w aspekcie komórkowym.* Post. Biol. Kom. 1999, 26, supl. 13, 1–68.

Nowis D., Gołąb J.: *Rola telomerów i telomerazy w progresji nowotworów. Perspektywy diagnostyczne i terapeutyczne.* Post. Biol. Kom. 2001, 28, 243.

Trzeciak A., Błasiak J.: *Naprawa DNA w komórkach ssaków.* Post. Biol. Kom. 1999, 26, 707.

Wójcik C., Wójcik M.: *Niebiałkowe inhibitory kinaz zależnych od cyklin.* Post. Biol. Kom. 2000, 27, 377.

ROZDZIAŁ 4

Apoptoza

Cezary Wójcik

HASŁA

Anoikis

Apoptoza wywołana przez utratę połączenia komórek z substancją międzykomórkową i/lub innymi komórkami. Zależy od uwolnienia białka Bim z podrodziny białek BH3. Bim jest utrzymywane w nieaktywnej formie poprzez powiązanie z elementami cytoszkieletu. Po uwolnieniu Bim aktywuje białka Bax i Bak, prowadząc do aktywacji wewnątrzpochodnego szlaku apoptozy.

Apoptoza

Proces programowanej śmierci komórek, charakteryzujący się aktywacją szeregu specyficznych szlaków biochemicznych. Wyróżnia się fazę **inicjacji** i fazę **egzekucji** apoptozy. Inicjacja może przebiegać poprzez szlak wewnątrzpochodny lub zewnątrzpochodny, prowadząc ostatecznie do aktywacji kaspaz inicjatorowych, które z kolei aktywują kaspazy egzekutorowe, odpowiedzialne za fazę egzekucji.

Apoptosom

Olbrzymi (~1,4 MDa) kolisty heptamer powstający w cytozolu z białka APAF1, ulegającego oligomeryzacji pod wpływem uwolnionego z mitochondriów cytochromu c. Apoptosom rekrutuje cząsteczki prokaspazy 9, doprowadzając do ich autokatalitycznej aktywacji, charakterystycznej dla szlaku wewnątrzpochodnego inicjacji apoptozy.

Białka Bcl-2

Heterogenna grupa białek regulująca wewnątrzpochodny szlak apoptozy. **Bcl-2** i **Bcl-X_L** są białkami zapobiegającymi apoptozie. Charakteryzują się one czterema domenami homologii Bcl2 (BH1234). Proapoptotyczne białka z tej grupy można podzielić na białka posiadające trzy domeny BH (**białka BH123**) oraz białka posiadające tylko domenę **BH3**. Głównymi białkami BH123 są **Bax** i **Bak**, podczas gdy do białek BH3 zalicza się **Bid, Bim, Bad** oraz **Puma**. Białka Bcl-2 mogą występować w cytoplazmie, jednak większość z nich jest białkami wbudowanymi w zewnętrzną błonę mitochondrialną i/lub błonę siateczki śródplazmatycznej.

Ciałka apoptotyczne

Pozostałości po apoptotycznej komórce, otoczone błoną komórkową fragmenty cytoplazmy zawierające funkcjonalne organelle i skondensowane resztki chromatyny. Ulegają fagocytozie przez sąsiadujące komórki, bez wywoływania odczynu zapalnego.

Kaspazy

Rodzina proteaz cysteinowych hydrolizujących wiązania peptydowe C-końcowe od reszt kwasu asparaginowego. Można je podzielić na kaspazy

inicjatorowe (2, 8, 9, 10), kasapzy egzekutorowe (3, 6, 7) oraz kaspazy nieapoptotyczne (1, 4, 5), związane z procesami zapalnymi. Występują w komórkach jako prokaspazy, ulegające aktywacji wskutek dimeryzacji i ograniczonej proteolizy.

Kompleks sygnalizacyjny śmierci, DISC (ang. *death inducing signaling complex*)

Kompleks aktywowanych ligandami receptorów śmierci cytoplazmatycznych białek adaptorowych i prokaspaz inicjatorowych 8 i/lub 10, prowadzący do ich aktywacji, a co za tym idzie – do transdukcji sygnału śmierci, charakteryzujący szlak zewnątrzpochodny inicjacji apoptozy.

Martwica (nekroza)

Proces śmierci komórek wywołany nieodwracalnym uszkodzeniem komórek przez takie czynniki, jak niedotlenienie, duże dawki promieniowania, substancje toksyczne, wysoka temperatura itp. Charakteryzuje się chaotyczną inaktywacją wszystkich szlaków biochemicznych, denaturacją białek, obrzękiem cytoplazmy, uwolnieniem enzymów lizosomalnych, utratą ciągłości błony komórkowej i rozpadem komórki, albo też przeciwnie jej obkurczeniem. Zmiany te wywołują silny odczyn zapalny.

p53

Białko zwane strażnikiem genomu. Nieodwracalne uszkodzenie DNA powoduje aktywację p53 prowadzącą do ekspresji białek z grupy BH3, takich jak **Puma**, aktywujących białka Bak i Bax, rozpoczynające wewnątrzpochodny szlak aktywacji apoptozy. p53 jest zmutowane w ponad 50% ludzkich nowotworów.

Receptory śmierci

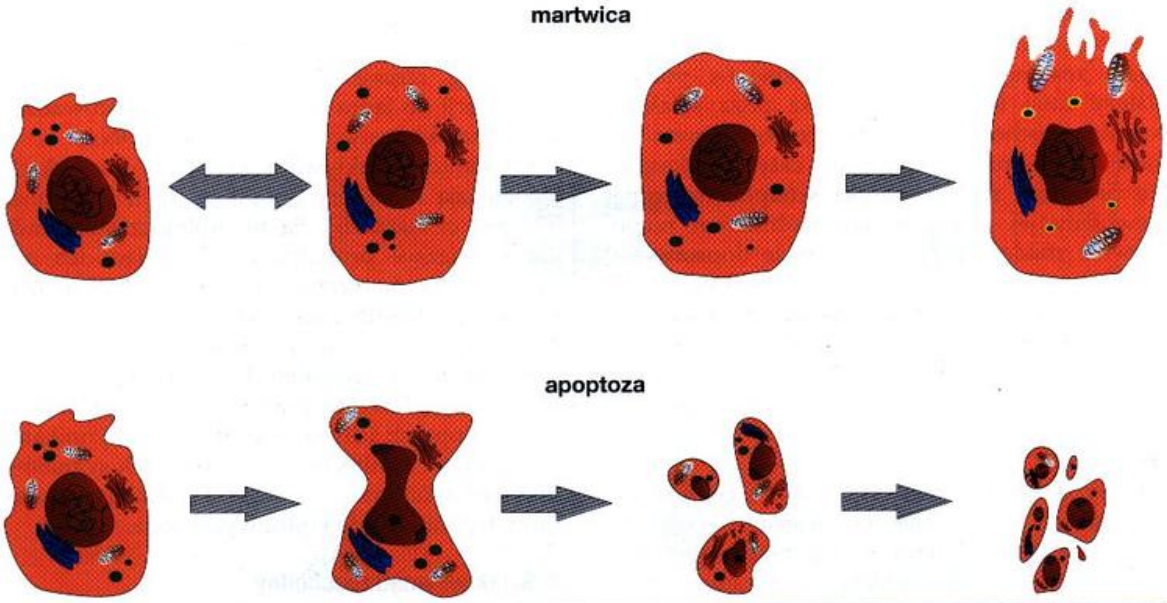
Występujące na powierzchni komórek białka, takie jak **FAS** oraz **receptor dla TNF typu I**, których wspólną cechą jest transdukcja sygnału powodującego uruchomienie kaskady kaspaz poprzez szlak zewnątrzpochodny.

Apoptoza a martwica

Komórki mogą ginąć na dwa różne sposoby, poprzez **programowaną śmierć komórek** lub poprzez **martwicę**, czyli **nekrozę**. Programowana śmierć komórek jest niezbędną częścią rozwoju i funkcjonowania organizmów wielokomórkowych. Najczęstszą formą programowanej śmierci komórek jest **apoptoza**. Oba te pojęcia są używane często zamiennie, choć jest to pewne uproszczenie. Niewiele jednak wiadomo na temat innych mechanizmów programowanej śmierci komórek. Termin „apoptoza" pochodzi od greckiego słowa oznaczającego opadanie liści z drzew lub płatków z kwiatu.

Martwicę i apoptozę można rozróżnić na podstawie wielu kryteriów morfologicznych i biochemicznych. Apoptoza jest procesem aktywnym, wymagającym uruchomienia wielu uśpionych szlaków biochemicznych oraz syntezy nowych białek, podczas gdy martwica jest procesem pasywnym, spowodowanym czynnikami zewnątrzpochodnymi, powodującymi rozległe uszkodzenia komórek. Inną ważną cechą odróżniającą apoptozę od martwicy jest to, że dotyczy ona z reguły pojedynczych komórek rozsianych w obrębie danego narządu lub tkanki, podczas gdy martwicy ulegają z reguły ich zwarte skupiska. Apoptoza pojedynczych komórek następuje zwykle niezależnie, natomiast martwica zachodzi zazwyczaj masowo w jednym określonym momencie. Pojawienie się komórek apoptotycznych nie wywołuje zauważalnej reakcji ze strony otaczających komórek i tkanek, zaś martwicy najczęściej towarzyszy proces zapalny, co w preparatach histologicznych wyraża się pojawieniem się nacieku z granulocytów obojętnochłonnych i/lub makrofagów. Schemat porównujący zmiany zachodzące w komórkach ulegających martwicy ze zmianami w komórkach ulegającymi apoptozie przedstawiony jest na ryc. 4.1.

Komórki martwicze ulegają obrzękowi, co doprowadza do rozerwania błony komórkowej i wylania się cytoplazmy do przestrzeni zewnątrzkomórkowej. Jednocześnie pękają błony otaczające lizososmy i mitochondria, a ich zawartość miesza się z cytozolem. W przeciwieństwie do tego, komórki apoptotyczne kurczą się, a błona komórkowa nie ulega przerwaniu, lecz charakterystycznemu uwypukleniu. Prowadzi to do podziału komórki



Rycina 4.1 Schemat przedstawiający porównanie zmian morfologicznych zachodzących w przebiegu martwicy i apoptozy. W przebiegu martwicy komórka ulega obrzmieniu, następnie dochodzi do denaturacji białek, inaktywacji szlaków biochemicznych, obrzmienia mitochondriów. Wreszcie pęka błona komórkowa, uszkodzeniu ulegają lizosomy i następuje rozpad jądra komórkowego. W przebiegu apoptozy uruchomione zostają szlaki biochemiczne, doprowadzające do kondensacji chromatyny, fałdowania komórki i wreszcie jej rozpadu na ciałka apoptotyczne, zawierające nieuszkodzone organelle i fragmenty jądra komórkowego ze skondensowaną chromatyną. Modyfikacja z „Apoptosis and Cell Proliferation Manual" 2nd Edition, za pozwoleniem Roche Diagnostics Corporation.

na wiele otoczonych błoną fragmentów, zwanych **ciałkami apoptotycznymi** (ang. *apoptotic bodies*). Ciałka apoptotyczne zawierają cytoplazmę i funkcjonalne organelle. Chromatyna ulega kondensacji obwodowej, a kształt jądra komórkowego pozostaje długo niezmieniony. W końcowych stadiach apoptozy jądro z resztkami chromatyny rozpada się, a powstałe w ten sposób fragmenty dostają się do ciałek apoptotycznych. Ciałka apoptotyczne są fagocytowane przez sąsiadujące komórki lub makrofagi.

Na poziomie biochemicznym w komórkach martwiczych następuje trawienie składników komórki poprzez uwolnione hydrolazy lizosomalne. Denaturacja białek prowadzi do zaprzestania aktywności większości enzymów cytoplazmatycznych, podczas gdy DNA rozpada się na fragmenty różnorodnej wielkości. W odróżnieniu od tego, w komórkach apoptotycznych przebiega zaprogramowana aktywacja niektórych szlaków biochemicznych, doprowadzająca do wybiórczej proteolizy wybranych składników komórek. DNA jest cięte na fragmenty o wielkości 180–200 par zasad (i ich wielokrotności), co odpowiada odcinkom pomiędzy sąsiadującymi nukleosomami.

Apoptoza występuje zarówno w organizmach podlegających rozwojowi zarodkowemu, płodowemu i pozapłodowemu, jak i w dojrzałym organizmie. Może występować fizjologicznie lub też pojawiać się w przebiegu procesów patologicznych. Nekroza jest z reguły procesem patologicznym, lecz niekiedy występuje także fizjologicznie, np. w czasie cyklicznego złuszczania się warstwy czynnościowej błony śluzowej macicy.

Proces apoptozy dzieli się na dwa główne etapy – **inicjacji,** czyli rozpoczęcia apoptozy, oraz **egzekucji,** czyli wykonania apoptozy. Egzekucja apoptozy zależy od aktywacji proteaz, zwanych **kaspazami**, które degradują szereg kluczowych białek w komórce. Podczas gdy egzekucja przebiega zawsze w ten sam sposób, różnie może przebiegać faza inicjacji apoptozy. Wyróżnia się dwa główne szlaki inicjacji apoptozy – **szlak wewnątrzpochodny** i **szlak zewnątrzpochodny**. Szlak wewnątrzpochodny ulega aktywacji pod wpływem czynników uszkadzających DNA, braku działania czynników troficznych lub zaburzonych oddziaływań komórki z macierzą zewnątrzkomórkową (**anoikis**). Szlak zewnątrzpochodny zostaje uruchomiony poprzez oddziaływanie z inną komórką i/lub wydzielonymi

przez nią białkami, takimi jak czynnik martwicy nowotworów (**TNF**) lub **FAS-ligand**. Obydwa te szlaki zostaną szczegółowo omówione poniżej. Należy tutaj też wspomnieć, iż poza szlakiem wewnątrzpochodnym i zewnątrzpochodnym istnieją też alternatywne metody aktywacji kaspaz. Na przykład, **stres siateczki śródplazmatycznej** wywołany jej przeciążeniem nadmiarem niepoprawnie sfałdowanych białek może doprowadzić do aktywacji związanej z siateczką prokaspazy 12. Aktywacja kaspaz może też nastąpić wskutek działania **granzymu B**, enzymu proteolitycznego, który jest wprowadzany do cytoplazmy komórki docelowej przez cytotoksyczne limfocyty T.

Kaspazy

Mianem **kaspaz** określa się rodzinę proteaz cysteinowych hydrolizujących wiązania peptydowe C-końcowe od reszt kwasu asparaginowego. Kaspazy oznaczone są kolejnymi cyframi arabskimi. Można je podzielić na kaspazy **inicjatorowe** (2, 8, 9, 10), kaspazy **egzekutorowe** (3, 6, 7) oraz kaspazy **nieapoptotyczne** (1, 4, 5), związane z procesami zapalnymi. Występują one w cytoplazmie jako nieaktywne proenzymy, czyli **prokaspazy**. Aktywacja kaspaz następuje wskutek ich proteolizy na łańcuch długi i krótki oraz ulegającą odrzuceniu prodomenę. Dwa łańcuchy krótkie i dwa łańcuchy długie agregują, tworząc aktywny tetramer, posiadający dwa miejsca katalitycznie aktywne.

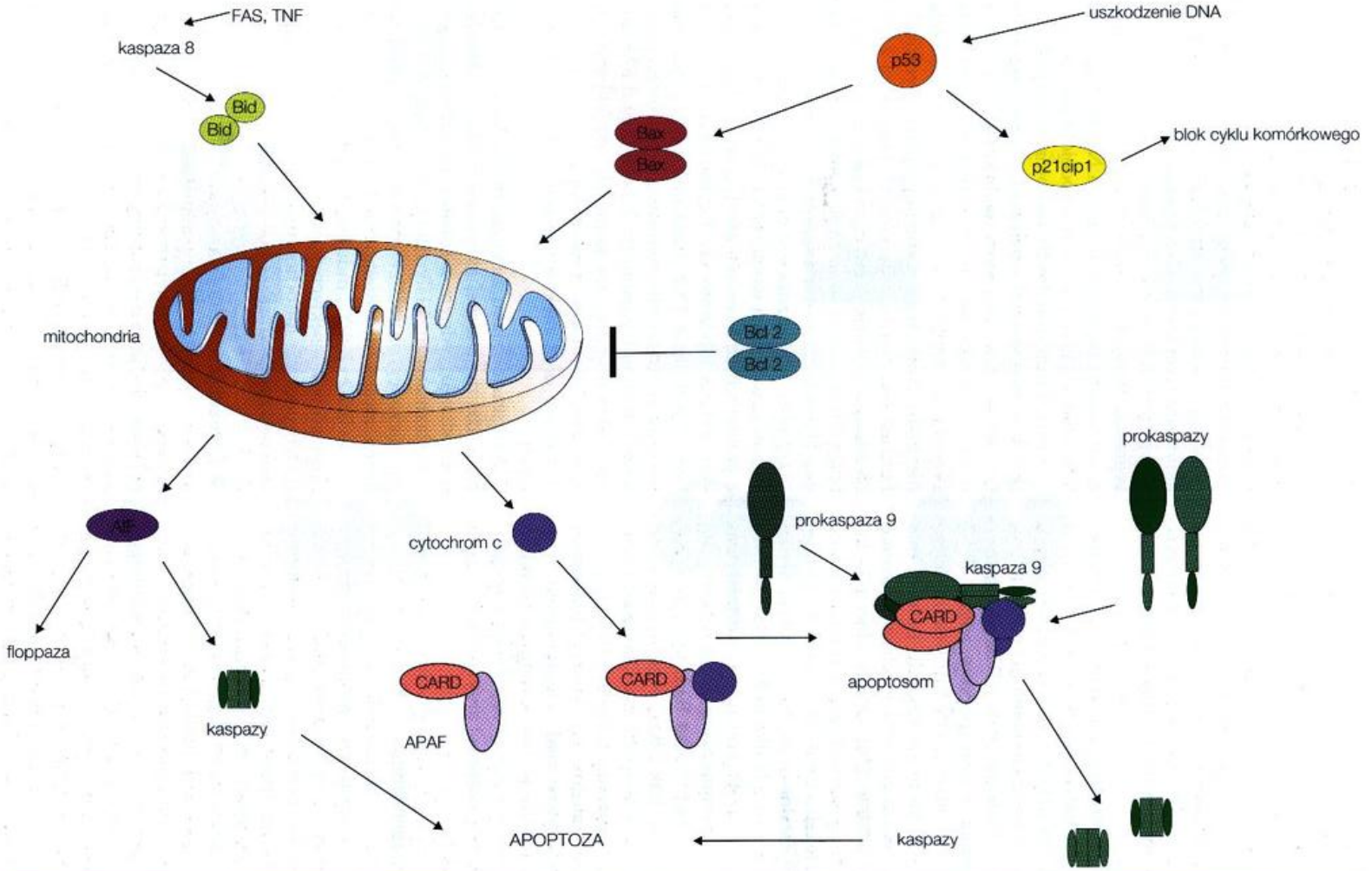
Aktywacja kaspaz zwykle zachodzi poprzez proteolizę zależną od innych kaspaz, co dostarcza mechanizmu dodatniego sprzężenia zwrotnego w procesie egzekucji apoptozy. Prodomeny prokaspaz inicjatorowych zawierają sekwencję zwaną **domeną rekrutacji kaspaz,** czyli **CARD** (ang. *caspase recruitment domains*). CARD uczestniczy w oddziaływaniach z białkami aktywatorowymi, prowadząc do powstania kompleksów aktywacyjnych, takich jak **apoptosom** (szlak wewnątrzpochodny) lub **kompleks sygnalizacyjny śmierci,** czyli DISC (ang. *death-inducing signaling complex*, szlak zewnątrzpochodny), pod wpływem bodźców indukujących apoptozę. W obrębie takich kompleksów cząsteczki prokaspaz ulegają autokatalitycznej aktywacji. Z kolei pozbawione CARD prokaspazy egzekutorowe aktywowane są poprzez kaspazy inicjatorowe. Kaspazy inaktywują szereg białek komórkowych, doprowadzając do charakterystycznych zmian biochemicznych i morfologicznych apoptozy. Wśród ich substratów należy wymienić **laminy jądrowe** oraz **białko inhibitorowe DNAzy zależnej od kaspaz,** czyli ICAD (ang. *inhibitor of caspase activated DNAse*). Inaktywacja ICAD uwalnia i aktywuje DNAzę zależną od kaspaz, czyli **CAD** (ang. *caspase activated DNAse*). CAD ulega translokacji do jądra komórkowego, doprowadzając do charakterystycznej fragmentacji DNA.

Spontanicznej aktywacji kaspaz w komórkach zapobiegają inhibitory apoptozy, czyli **IAP** (ang. *inhibitors of apoptosis*). Są to drobnocząsteczkowe białka, wiążące prokaspazy i blokujące ich aktywność enzymatyczną. Niektóre z białek IAP wykazują ponadto aktywność ligaz ubikwityny, doprowadzając do ubikwitynacji prokaspaz, co w konsekwencji prowadzi do ich rozkładu przez proteasomy (rozdz. 8). Białka IAP mogą ulec inaktywacji poprzez ich oddziaływanie z czynnikami uwalnianymi z mitochondriów wskutek sygnałów proapoptotycznych. Jednakże rola takich inaktywatorów IAP nie jest do końca wyjaśniona.

Szlak wewnątrzpochodny

Szlak wewnątrzpochodny ulega aktywacji wskutek braku odpowiednich sygnałów troficznych, w wyniku uszkodzenia DNA lub zaburzenia oddziaływania z innymi komórkami i/lub macierzą zewnątrzkomórkową (**anoikis**). Inicjacja szlaku wewnątrzpochodnego zależy od uwolnienia białek znajdujących się w przestrzeni międzybłonowej mitochondrium (ryc. 4.2), przede wszystkim **cytochromu c**, który dostawszy się do cytoplazmy, łączy się z białkiem **APAF1** (ang. *apoptosis protease activating factor*), doprowadzając do powstania olbrzymiego (~1.4 MDa) kolistego heptameru APAF1, zwanego **apoptosomem.** Apoptosom rekrutuje cząsteczki prokaspazy 9, doprowadzając do ich autokatalitycznej aktywacji, charakterystycznej dla szlaku wewnątrzpochodnego inicjacji apoptozy. Innym białkiem uwalnianym z mitochondriów jest czynnik aktywujący apoptozę **AIF** (ang. *apoptosis inducing factor*). AIF prowadzi do aktywacji floppazy, endonukleazy CAD oraz pośrednio do aktywacji kaspaz.

Uwolnienie cytochromu c z mitochondriów znajduje się pod ścisłą kontrolą białek z rodziny **Bcl-2.** Jest to heterogenna grupa białek regulująca wewnątrzpochodny szlak apoptozy. Antyapoptotyczne białka z tej grupy to **Bcl-2** i **Bcl-X_L**, charakteryzujące się czterema domenami homologii Bcl2 (BH1234). Proapoptotyczne białka z tej grupy można podzielić na białka posiadające trzy domeny BH (**białka BH123)** oraz posiadające tylko jedną domenę BH (**białka BH3)**. Głównymi białkami BH123 są **Bax** i **Bak**. Podrodzina białek BH3 jest bardzo liczna i obejmuje takie białka, jak **Bid, Bim, Bad**



Rycina 4.2 Schemat przedstawiający wewnątrzpochodny szlak aktywacji apoptozy, w którym centralną rolę odgrywają mitochondria. Uwolnienie cytochromu c z przestrzeni międzybłonowej zależy od równowagi między anty-apoptotycznymi Bcl-2 i Bcl-X_L a pro-apoptotycznymi Bak i Bax. Równowaga może być przechylona na korzyść apoptozy poprzez aktywację białek BH3, takich jak: PUMA (uszkodzenie DNA), BIM (zaburzenie oddziaływania komórki z macierzą zewnątrzkomórkową), Bad (brak czynników wzrostu) lub tBid (aktywacja szlaku zewnątrzpochodnego). Uwolniony cytochrom c oddziałuje z białkiem APAF1, prowadząc do powstania złożonego heptameru, zwanego apoptosomem, który następnie przyłącza dwie cząsteczki prokaspazy 9, doprowadzając do ich autokatalitycznej aktywacji. Kaspaza 9 aktywuje kaspazy efektorowe, uruchamiając egzekucję apoptozy. Aktywacji kaspaz mogą przeciwdziałać inhibitory apoptozy, zwane IAPs.

czy **Puma**. Białka z rodziny Bcl-2 tworzą ze sobą homo- i heterodimery utrzymujące się w stanie wzajemnej równowagi. Mogą one tworzyć kanały jonowe w zewnętrznej błonie mitochondrialnej, których aktywacja doprowadza do uwolnienia białek z przestrzeni międzybłonowej do cytozolu. Inicjacja wewnątrzpochodnego szlaku apoptozy zależy od przechylenia się równowagi na korzyść białek proapoptotycznych, co może nastąpić w rozmaity sposób.

Na przykład, zaburzenia oddziaływania komórki z macierzą zewnątrzkomórkową i/lub innymi komórkami doprowadza do uwolnienia białka **Bim**, normalnie związanego z elementami cytoszkieletu. Bim wiąże się z białkami Bak i Bax, uwalniając je od odziaływania z antyapoptotycznymi Bcl-2 i Bcl-X_L. Z kolei uszkodzenia DNA prowadzą do aktywacji białka **p53**, które ze względu na swą rolę zwane jest strażnikiem genomu. Jeżeli uszkodzenie genomu jest niewielkie i/lub odwracalne, p53 indukuje blok w cyklu komórkowym, umożliwiający naprawę DNA. Jeżeli jednak uszkodzenia są rozległe i/lub nieodwracalne, następuje indukcja białka **Puma**. Puma wiąże się z białkami Bak i Bax, prowadząc do ich aktywacji. W końcu brak oddziaływania odpowiednich czynników wzrostu na komórkę prowadzi do aktywacji białka **Bad**, które również wiąże się z białkami Bak i Bax, przechylając szalę równowagi na korzyść apoptozy. Obecność czynników wzrostu zapobiega aktywacji Bad, poprzez jego fosforylację zależną od **kinazy białkowej B (Akt)**. Fosforylowane Bad tworzy nieaktywny kompleks w cytozolu w powiązaniu z białkiem 14-3-3. Inne czynniki wzrostu zapobiegają apoptozie poprzez indukcję ekspresji antyapoptotycznych białek Bcl-2 i Bcl-X_L.

Szlak zewnątrzpochodny

Komórki mogą być „zmuszane" do samobójczej śmierci przez aktywację tzw. **receptorów śmierci** (ryc. 4.3). Receptory śmierci tworzą rodzinę receptorów, której głównymi przedstawicielami są **receptor dla TNF typu I** (ang. *tumor necrosis factor*, czynnik martwicy nowotworów) oraz **receptor FAS** (ang. *apoptosis stimulating fragment*, fragment pobudzający apoptozę). Receptory te posiadają część zewnątrzkomórkową, wiążącą ligand, część transbłonową i część cytoplazmatyczną, zawierającą tzw. **domenę śmierci** (ang. *death domain*). Po związaniu się ligandów receptory te ulegają trimeryzacji. Umożliwia to wiązanie się białek adaptorowych, które zawierają zarówno domenę śmierci, umożliwiającą wiązanie się z domeną śmierci receptora, jak i oddzielną domenę efektorową śmierci, która jest zdolna do przyłączania prokaspazy 8 i/lub 10. Tak powstały megakompleks aktywowanych ligandami receptorów śmierci, cytoplazmatycznych białek adaptorowych i prokaspaz inicjatorowych nazywa się **kompleksem sygnalizacyjnym śmierci,** czyli **DISC** (ang. *death-inducing signaling complex*). Należy zaznaczyć, że aktywacja receptorów TNF typu I może w przypadku niektórych komórek uruchamiać odmienny szlak sygnalizacyjny, prowadzący do aktywacji związanego ze stanem zapalnym czynnika NFκB. Aktywacja tego szlaku sygnalizacyjnego zapobiega apoptozie.

Oprócz funkcjonalnych receptorów transdukujących sygnał śmierci występują też na niektórych komórkach tzw. **receptory wabikowe** (ang. *decoy receptors*). Wiążą one ligand, jednak nie przekazują sygnału proapoptotycznego, gdyż nie posiadają niezbędnych do tego domen cytoplazmatycznych. Funkcja receptorów wabikowych polega na zapobieganiu apoptozie poprzez rekrutację proapoptotycznych ligandów, a co za tym idzie – zapobieganiu ich oddziaływaniu z receptorami śmierci.

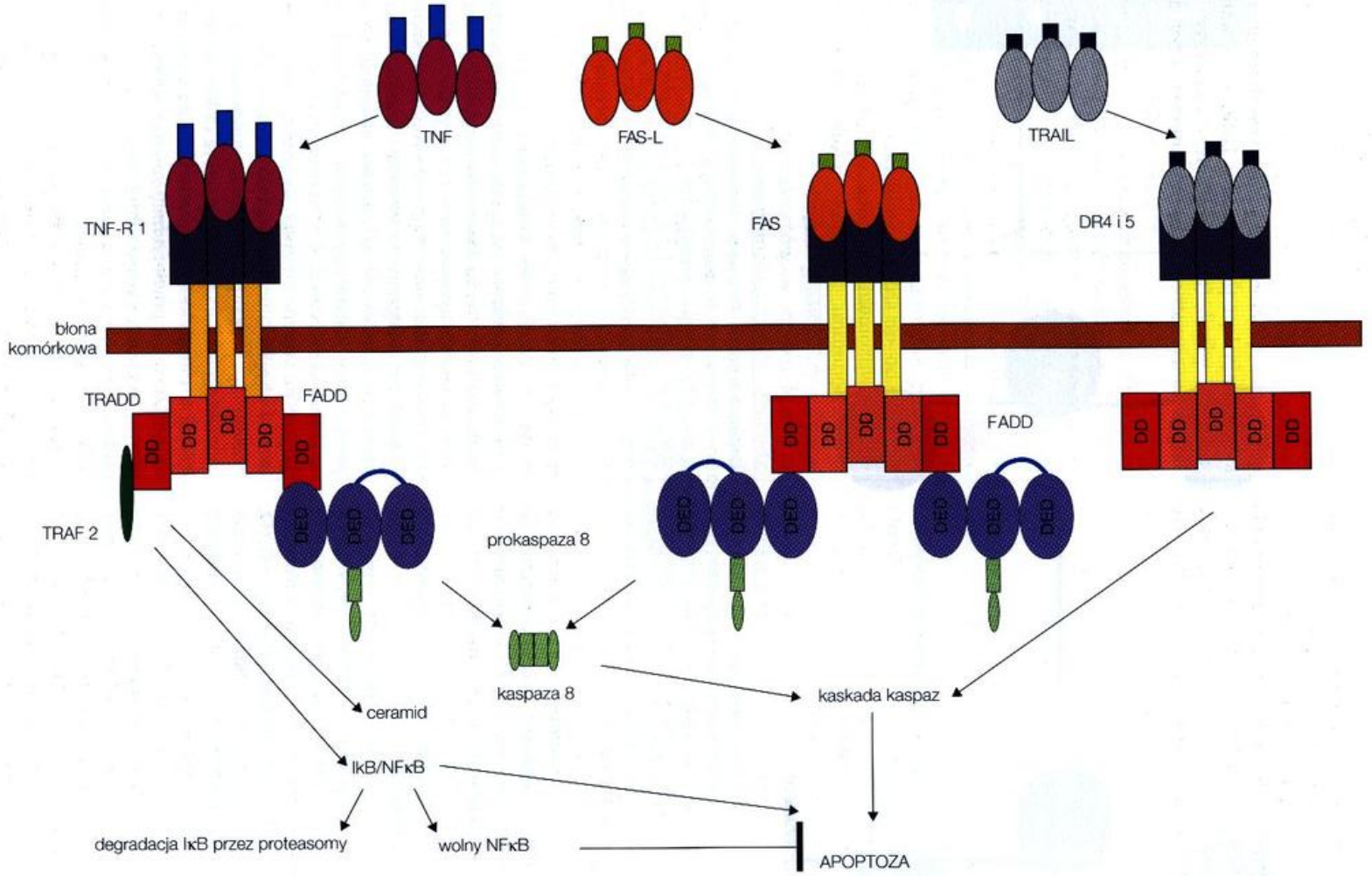
Ligandy przekazujące sygnał śmierci mogą występować w postaci wolnej (TNF) lub też związanej z powierzchnią komórek efektorowych, takich jak komórki NK lub limfocyty T cytotoksyczne (ligand FAS). Uwalnianie TNF przez makrofagi powoduje masową apoptozę obserwowaną w przebiegu przewlekłych chorób zapalnych. Z kolei ligand FAS doprowadza do apoptozy komórek zainfekowanych wirusami, komórek przeszczepów niezgodnych tkankowo oraz niektórych komórek nowotworowych.

Aktywacja szlaku zewnątrzpochodnego zwykle prowadzi do wtórnej aktywacji szlaku wewnątrzpochodnego. Jednym z substratów kaspazy 8 jest cytoplazmatyczne białko BH3, zwane **Bid**. Wskutek ograniczonej proteolizy powstaje jego aktywna forma, zwana **tBid**. Białko tBid blokuje antyapoptotyczne Bcl-2 i Bcl-X_L, indukując oligomeryzację Bak i Bax, co w konsekwencji prowadzi do uwolnienia cytochromu c z mitochondriów i aktywacji szlaku wewnątrzpochodnego.

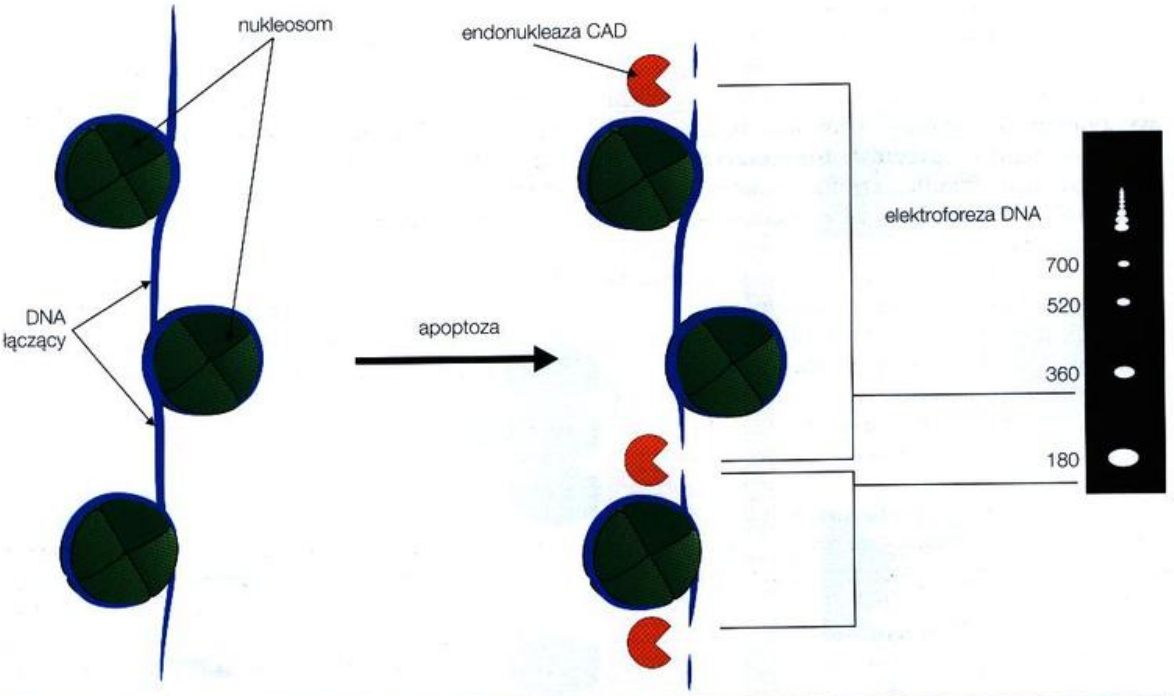
Egzekucja apoptozy

Faza egzekucji apoptozy przebiega w zbliżony sposób w przypadku mechanizmu zarówno wewnątrzpochodnego, jak i zewnątrzpochodnego. Można ją podzielić dodatkowo na trzy stadia – uwolnienia, uwypuklania i kondensacji.

Stadium **uwolnienia** polega na uwolnieniu się komórki od połączeń z macierzą zewnątrzkomórkową i sąsiadującymi komórkami, co doprowadza



Rycina 4.3 Schemat przedstawiający transdukcję sygnałów proapoptotycznych, zachodzącą za pośrednictwem receptorów śmierci, takich jak receptor TNF typu I lub FAS. Związanie się ligandów ze swoistymi receptorami prowadzi do ich trimeryzacji, rekrutacji dodatkowych białek adaptorowych oraz prokaspazy 8 lub 10. Powstaje w ten sposób DISC, czyli kompleks sygnalizujący śmierci, który katalizuje aktywację kaspazy 8 lub 10. Po aktywacji kaspaza 8 lub 10 aktywuje kaspazy egzekutorowe. Sygnał proapoptotyczny ulega wzmocnieniu poprzez aktywację białka tBid, które uruchamia szlak wewnątrzpochodny. Aktywności kaspaz przeciwdziałają komórkowe inhibitory apoptozy IAPs.



Rycina 4.4 Schemat przedstawiający elektroforezę DNA jako metodę wykrywania apoptozy. Po lewej stronie przedstawiono fragment DNA związany z nukleosomami (dla uproszczenia pokazano jedynie rdzenie nukleosomów). W czasie apoptozy dochodzi do aktywacji nukleazy CAD, która tnie DNA pomiędzy nukleosomami, co prowadzi do powstania odcinków o wielkości 180–200 par zasad lub ich wielokrotności. DNA komórkowe można poddać elektroforezie na żelu agarozowym, co prowadzi do rozdzielenia się cząsteczek w zależności od ich wielkości. Można je uwidocznić poprzez wyznakowanie bromkiem etydium. DNA z komórek apoptotycznych wykazuje rozkład typowej „drabinki DNA" (prawa strona rysunku). Modyfikacja z „Apoptosis and Cell Proliferation Manual" 2nd Edition, za pozwoleniem Roche Diagnostics Corporation.

do przybrania przez komórkę kształtu zbliżonego do kulistego. Towarzyszą temu reorganizacja połączeń międzykomórkowych, utrata włókien naprężeniowych, rozpad mikrotubul oraz przebudowa cytoszkieletu aktynowego, doprowadzająca do brzeżnego ułożenia włókien, tuż pod błoną komórkową. Stadium uwolnienia jest wyraźnie zaznaczone w przypadku komórek przylegających do podłoża, takich jak komórki nabłonkowe lub fibroblasty. Aktywowane kaspazy prowadzą do proteolizy ICAD oraz aktywacji nukleazy CAD, która tnie DNA w odcinkach położonych pomiędzy sąsiadującymi nukleosomami, czyli co **180–200** par zasad. Z kolei degradacja lamin jądrowych umożliwia rozpad jądra komórkowego na mniejsze fragmenty. W stadium **uwypuklania** dochodzi do serii skurczów położonych obwodowo pęczków włókienek aktynowych wskutek ich oddziaływania z miozyną II. Uwypuklanie się błony jest ułatwione poprzez zależną od kaspaz degradację szeregu białek szkieletu błony komórkowej, oddziałujących z aktyną. W stadium **kondensacji** apoptotyczna komórka rozpada się na wiele **ciałek apoptotycznych**. Zjawisku temu towarzyszy depolimeryzacja aktyny. Ciałka apoptotyczne są szybko usuwane z tkanek poprzez makrofagi lub sąsiednie komórki.

Komórki ulegające apoptozie oraz ich fragmenty rozpoznawane są poprzez obecność na ich powierzchni **fosfatydyloseryny**. Fosfolipid ten w komórkach żywych lub martwiczych występuje jedynie po wewnętrznej stronie błony komórkowej oraz w obrębie błon wewnątrzkomórkowych. Tymczasem apoptoza prowadzi do uaktywnienia się błonowego białka – **floppazy**, która dokonuje translokacji fosfatydyloseryny z powierzchni wewnątrzkomórkowej na powierzchnię zewnątrzkomórkową błony. Związanie się fosfatydyloseryny z receptorem makrofagów nie tylko warunkuje fagocytozę ciałek apoptotycznych, lecz także wywołuje produkcję i uwolnienie przez makrofagi szeregu cytokin przeciwzapalnych (np. TGF-beta) oraz zahamowanie produkcji i wytwarzania cytokin prozapalnych.

Medyczne aspekty apoptozy

Równowaga pomiędzy podziałami, różnicowaniem się, migracją i apoptozą komórek determinuje ich liczbę w danej tkance czy narządzie. Zaburzenia prawidłowej liczby komórek przejawiające się zwiększeniem (**przerost, hiperplazja**) lub też zmniejszeniem (**zanik, atrofia**) liczby komórek w danej tkance lub narządzie występują w różnych stanach chorobowych.

Apoptoza odpowiada za programowaną śmierć komórek w przebiegu rozwoju zarodkowego i płodowego. Przykładem tutaj jest apoptoza komórek tworzących błony pomiędzy palcami w obrębie kończyn lub też apoptoza nadmiaru neuronów w obrębie ośrodkowego układu nerwowego. Zaburzenia apoptozy w czasie rozwoju zarodkowego prowadzą do ciężkich wad rozwojowych wywołanych nadmiarem komórek. Inną rolą apoptozy jest atrofia tkanek i narządów zależna np. od bodźców hormonalnych. Bez apoptozy niemożliwa byłaby negatywna selekcja komórek immunologicznie kompetentnych w obrębie grasicy lub eliminacja nadmiaru granulocytów w szpiku kostnym. W chorobach autoimmunologicznych dochodzi do zaburzenia apoptozy komórek rozpoznających i uszkadzających tkanki własne organizmu.

W przypadku większości komórek złożonego organizmu wielokomórkowego, takiego jak organizm ludzki, sygnałem do apoptozy jest już sam brak odpowiednich czynników wzrostu. Mechanizmy te zapobiegają pojawianiu się klonów komórek, których proliferacja wymknęłaby się spod kontroli organizmu jako całości. Gdy te mechanizmy zawodzą, pojawiają się **komórki nowotworowe**, uniezależniające się od obecności czynników wzrostu. Odbywa się to wskutek stałej aktywności zmutowanego białka normalnie pośredniczącego w transdukcji sygnałów zapobiegających apoptozie. Przykładem jest tutaj białko **Bcl-2**, którego nazwa pochodzi od chłoniaka komórek B (ang. *B-cell lymphoma*). Nadmierna, niekontrolowana ekspresja białka Bcl-2 zapobiega apoptozie nieprawidłowych komórek. Innym przykładem jest białko p53, które jest nieaktywne w ponad 50% przypadków nowotworów. Utrata aktywności p53 zapobiega indukcji bloku cyklu komórkowego oraz apoptozy wskutek uszkodzenia DNA. Również wiele wirusów potrafi blokować apoptozę komórek gospodarza, zapewniając sobie prawidłowe funkcjonowanie komórki niezbędne do ich replikacji. Na przykład, onkogenne wirusy brodawczaka ludzkiego czynią to poprzez indukcję ubikwitynacji i degradacji białka p53.

Podobnie jak zahamowanie apoptozy, również wzmożona apoptoza jest szkodliwa dla organizmu. Na przykład, przedłużający się stres siateczki śródplazmatycznej wywołuje apoptozę komórek beta wysepek Langerhansa w przebiegu cukrzycy. Apoptoza kardiomiocytów charakteryzuje niektóre kardiomiopatie. Występuje też w obszarze otaczającym martwicę wywołaną zawałem serca. Apoptoza neuronów jest składową wielu chorób degeneracyjnych ośrodkowego i obwodowego układu nerwowego, m. in. występuje w chorobie Alzheimera, chorobie Parkinsona, niektórych formach zaćmy i głuchoty. U pacjentów z udarem mózgu apoptoza neuronów otaczających obszar bezpośrednio uszkodzony doprowadza do znacznego powiększenia uszkodzenia.

Metody wykrywania apoptozy

Ocena preparatów w mikroskopie świetlnym pozwala odróżnić jedynie komórki w późnych stadiach apoptozy, gdy kondensacja chromatyny jest już zaawansowana. Nieco lepszą czułość zapewnia użycie mikroskopu fluorescencyjnego. Jednakże daleko większą czułość i specyficzność wykazują metody opierające się na technikach biochemicznych i immunocytochemicznych.

Do najpopularniejszych technik wykrywania apoptozy w preparatach histologicznych zalicza się metodę **TUNEL** (ang. *terminal deoxynucleotidyl transferase dependent nick end labeling*), czyli wyznakowanie wolnych końców DNA z udziałem końcowej transferazy deoksynukleotydów. Wolne końce 3′-hydroksylowe powstają wskutek aktywności nukleaz aktywnych w czasie apoptozy. Z kolei użycie przeciwciał monoklonalnych wykrywających epitopy aktywnych kaspaz, które są nieobecne na prokaspazach, pozwala na wyznakowanie komórek w początkowych stadiach apoptozy. Obecność w komórkach aktywnych kaspaz można też wykryć pośrednio poprzez odnalezienie charakterystycznych produktów degradacji ich substratów.

Kolejna metoda wykrywania apoptozy opiera się na zjawisku przemieszczania się fosfatydyloseryny do zewnętrznej powierzchni błony cytoplazmatycznej we wczesnych etapach apoptozy. W teście tym wykorzystuje się właściwość białka **aneksyny V** do wiązania się z fosfatydyloseryną. Aneksyna V wyznakowana znacznikiem fluorescencyjnym, takim jak fluoresceina, wiąże się z powierzchnią komórek apoptotycznych. Niestety, aneksyna V dostaje się też do środka komórek martwiczych i wiąże z wewnętrzną powierzchnią błony komórkowej. Ażeby odróżnić komórki

martwicze, stosuje się więc dodatkowe barwienie za pomocą **jodku propidium**. Jest to barwnik wiążący się z DNA, który nie przenika przez błony żywych komórek, nawet jeżeli znajdują się one w trakcie apoptozy, natomiast przenika bez trudu do komórek martwiczych. Komórki wyznakowane aneksyną i jodkiem propidium ogląda się w mikroskopie fluorescencyjnym lub analizuje za pomocą cytofotometrii przepływowej.

Standardową metodą biochemiczną pozwalającą na wykrycie apoptozy w danej populacji komórek jest **elektroforeza DNA na żelu agarozowym**, która pozwala rozdzielać cząsteczki DNA w zależności od ich masy (ryc. 4.4). Wskutek martwicy powstaje mieszanina cząsteczek DNA o różnej masie, co daje obraz rozmazanej smugi DNA, natomiast w czasie apoptozy powstają fragmenty DNA o wielkości ok. 180–200 par zasad i ich wielokrotności, co daje w żelu charakterystyczny obraz **drabinki DNA**. Modyfikacją tej metody biochemicznej jest tzw. **próba kometowa**, polegająca na tym, iż preparat histologiczny pokrywa się agarozą i przeprowadza się elektroforezę *in situ*, a następnie wybarwia się DNA bromkiem etydium i obserwuje preparat pod mikroskopem. Komórki ulegające apoptozie wykazują wówczas charakterystyczną smugę DNA ciągnącą się na kształt warkocza komety.

Piśmiennictwo

Lodish H., Berk A., Kaiser C.A., Krieger M., Bretscher A., Ploegh H., Amon A., Scott M.P.: *Molecular Cell Biology*. Wydanie 7. W.H. Freeman i sp. Nowy Jork 2013. Rozdział 21.4. *Cell Death And Its Regulation*. S. 1006–1018.

Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walker P.: *The Cell*. Wydanie 5. *Garland Science*. Nowy Jork 2008. Rozdział 18. *Apoptosis*. S. 1115–1129.

Youle R., Strasser A.: *The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death*. Nature Rev. Mol. Cell Biol. 2008, **9**, 47–59.

Tait S.W.G., Green D.R.: *Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond*. Nature Rev. Mol. Cell Biol. 2010, **11**, 621–632.

Riedl S.J., Salvese G.S.: *The apoptosome: signalling platform of cell death*. Nature Rev. Mol. Cell Biol. 2007, **8**, 405–413.

Rudnicka K.W., Szczęsna E., Miszczyk E., Mikołajczyk-Chmiela M.: *Apoptoza i autofagia – mechanizmy i metody detekcji*. Post. Biol. Kom. 2011, **38**, 247–265.

Stańczyk M., Majsterek I.: *Apoptoza – cel ukierunkowanej terapii przeciwnowotworowej*. Post. Biol. Kom. 2008, **35**, 467–484.

Wojtczak L., Zabłocki K.: *Mitochondria w życiu, chorobie i śmierci komórki*. Post. Bioch. 2008, **54**, 129–141.

ROZDZIAŁ 5

Mechanizmy rozwoju i różnicowania komórek

Maciej Zabel, Janusz Kubrakiewicz, Grażyna Hoser

HASŁA

Różnicowanie komórek

Proces, w którego wyniku dochodzi do stopniowej specjalizacji strukturalnej i funkcjonalnej komórek. U podstaw różnicowania leżą mechanizmy ustalające wzór ekspresji genów charakterystyczny dla danej linii komórkowej.

Ekspresja genów

Wyrażenie zawartej w genach informacji genetycznej w postaci cech struktury i funkcji komórki (fenotypu komórkowego). Ekspresja genów wymaga najczęściej dwóch procesów: transkrypcji (syntezy RNA) i translacji (syntezy białka na matrycy mRNA). W przypadku rRNA i tRNA zachodzi jedynie transkrypcja. Regulacja ekspresji genów może odbywać się w czasie transkrypcji i translacji oraz w czasie potranskrypcyjnych i potranslacyjnych modyfikacji produktów (RNA i białek). Poszczególne typy komórek zróżnicowanych mają odmienne wzory ekspresji genów, tj. charakterystyczny dla danego typu/linii komórek zestaw genów ulegających ekspresji

Modyfikacje epigenetyczne

Zmiany w ekspresji genów, będące następstwem dołączania/odłączania grup metylowych do DNA, modyfikacji białek histonowych, zależnej od ATP przebudowy chromatyny, interferencji RNA. Różnorodność komórek wywodzących się z jednej komórki macierzystej jest skutkiem regulacji informacji zawartej w kodzie DNA na drodze innych mechanizmów niż zmiana sekwencji nukleotydów. Regulacja epigenetyczna istotna jest w procesach różnicowania komórek, rozwoju zarodkowego, odpowiedzi komórek na stres, transformacji nowotworowej. W odpowiadających sobie genach osobników żeńskich i męskich można obserwować różne modyfikacje epigenetyczne. Modyfikacje epigenetyczne są podstawą różnych wzorów ekspresji genów.

Dojrzewanie komórek

Proces o charakterze ilościowym zachodzący od chwili ustalenia wzoru aktywności genetycznej komórki do czasu uzyskania właściwego fenotypu komórkowego. Dojrzewanie może polegać na stopniowym gromadzeniu charakterystycznych substancji i struktur komórkowych oraz osiągnięciu odpowiednich rozmiarów i kształtu.

Pamięć komórkowa

Zdolność komórek do zachowania i dziedziczenia charakterystycznego dla danej linii komórkowej wzoru ekspresji genów. Mechanizm pamięci komórkowej może wymagać obecności odpowiednich białek regulatorowych, modyfikacji chemicznej DNA (metylacji) lub przekształcenia struktury przestrzennej chromatyny (kondensacji i dekondensacji poszczególnych regionów chromosomów).

Czynniki transkrypcyjne

Białka, których obecność jest niezbędna do rozpoczęcia i regulacji przebiegu transkrypcji w komórkach eukariotycznych.

Determinanty cytoplazmatyczne

Zlokalizowane w cytoplazmie makromolekuły (mRNA, białka), których obecność wpływa na kierunek różnicowania komórek. Mogą podlegać asymetrycznej dystrybucji w czasie podziałów komórkowych, co przyczynia się do zróżnicowania komórek potomnych. Determinanty cytoplazmatyczne zlokalizowane w cytoplazmie komórki jajowej (ooplazmie) i asymetrycznie rozmieszczane do powstających w czasie bruzdkowania blastomerów noszą nazwę determinantów ooplazmatycznych.

Asymetryczne podziały komórkowe

Podziały mitotyczne, w wyniku których determinanty zawarte w cytoplazmie komórki dzielącej się zostają nierównomiernie rozdzielone do komórek potomnych.

Geny homeotyczne

Geny zawierające konserwatywną ewolucyjnie sekwencję nukleotydową zbudowaną z około 180 par zasad, zwaną homeoboksem. Ekspresja genu homeotycznego prowadzi do utworzenia białka, którego część stanowi tzw. homeodomena, 61-aminokwasowy odcinek powstały na matrycy homeoboksu. Podobnie jak inne motywy wiążące DNA (palce cynkowe, zamki leucynowe i in.), homeodomeny mają zdolność do oddziaływania z sekwencjami regulatorowymi DNA i wpływają na proces transkrypcji (są czynnikami transkrypcyjnymi). Geny homeotyczne pełnią istotną funkcję w determinacji procesów rozwojowych. Mutacje niektórych genów homeotycznych prowadzą do powstawania poważnych deformacji rozwojowych polegających na tworzeniu dobrze wykształconych organów w miejscu innych narządów (proces ten nosi nazwę homeozy), np. u muszki owocowej *Drosophila melanogaster* w miejscu czułków pojawiają się odnóża.

Indukcja

Rodzaj oddziaływań międzykomórkowych, w którym jedna grupa komórek (komórki indukujące) wpływa na kierunek różnicowania innej grupy komórek (komórki indukowane). Mechanizm oddziaływań indukcyjnych polega na interakcji produkowanego przez komórkę indukującą ligandu (czynnika indukcyjnego) z obecnym na powierzchni komórki indukowanej receptorem. Pobudzenie receptora generuje ciąg reakcji wewnątrzcytoplazmatycznych (transdukcja sygnału indukcyjnego), których końcowym efektem jest uaktywnienie czynników transkrypcyjnych i ustalenie nowego wzoru ekspresji genów w komórce.

Morfogeny

Substancje chemiczne, których gradient stężenia w środowisku ma wpływ na zróżnicowanie komórek. Wzory (układy) przestrzennego zróżnicowania komórek w tworzącej się tkance (narządzie) zależą od kompetencji komórek do reagowania na obecność morfogenu oraz od progowych wartości jego stężenia.

Informacja pozycyjna

Określenie zdolności komórek do interpretacji swego położenia w tkance/narządzie, a tym samym do ustalenia sposobu różnicowania w zależności od zajmowanego miejsca (pozycji) w zarodku.

Komórka totipotencjalna

Komórka zdolna do wytworzenia wszelkich typów komórek zróżnicowanych, charakterystycznych dla danego organizmu. W pełni totipotencjalna jest zapłodniona komórka jajowa (zygota) i pierwsze blastomery w etapach wzrostu przedimplantacyjnego, dające początek tkankom zarodka oraz tkankom pozazarodkowym.

Komórka pluripotencjalna

Komórka zdolna do różnicowania się w dowolny typ komórek somatycznych organizmu (poza komórkami tkanek pozazarodkowych). Z komórek pluripotencjanych powstają wszystkie tkanki organizmu.

Komórka macierzysta

Rodzaj niezróżnicowanej komórki, która ma jednocześnie zdolność do samoodnawiania się i do tworzenia zróżnicowanego potomstwa. Obecność komórek macierzystych jest jednym z warunków stałej odnowy tkankowej, np. tkanki nabłonkowej, krwionośnej.

Indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste (iPS, ang. *induced Pluripotent Stem*)

Dojrzałe komórki somatyczne, do których za pomocą wektora wprowadzono geny (np.: Sox2, Oct4, Klf4, nanog) odpowiedzialne za pluripotencję i podziały komórkowe. Komórki iPS mogą być indukowane odpowiednimi czynnikami do różnicowania w różne tkanki organizmu.

Komórki ukierunkowane (ang. *committed cells*)

Komórki ograniczone do jednego kierunku różnicowania. Wykazują dużą aktywność podziałową, lecz nie mają zdolności do samoodnawiania się. Proliferacja komórek ukierunkowanych przyczynia się do zwiększenia liczby zróżnicowanych komórek jednego typu.

Populacja komórek

Grupa komórek o tym samym fenotypie, takich samych zdolnościach proliferacyjnych i tym samym kierunku różnicowania się.

Klon komórkowy

Potomstwo jednej komórki rodzicielskiej.

Nisza komórkowa

Mikrośrodowisko komórek macierzystych, w którym zachodzą pomiędzy komórkami macierzystymi a komórkami niszy, komórkami macierzystymi a macierzą zewnątrzkomórkową, oddziaływania przez cząstki sygnalizacyjne (cytokiny, czynniki wzrostowe), czynniki mitogenne, morfogenne. Komórki niszy utrzymują komórki macierzyste w stanie uśpienia, hamują ich różnicowanie, izolują przed czynnikami indukującymi różnicowanie, apoptozę. Na utrzymanie w stanie „uśpienia" (*quiescent*) komórek macierzystych w niszy ma wpływ pH oraz stężenie tlenu w tym mikrośrodowisku. Przesunięcie komórek macierzystych na obrzeża niszy czyni je podatnymi na sygnały do podziałów, różnicowania i opuszczenia niszy.

Aplazja

Brak narządu/tkanki lub części ciała spowodowany zaburzeniem rozwojowym.

Atrofia

Stopniowy zanik tkanki/narządu spowodowany najczęściej długotrwałym niedoborem substancji odżywczych.

Inwolucja

Proces prowadzący do zaniku narządu wywołany fizjologicznym niedoborem substancji koniecznych do prawidłowego funkcjonowania lub związany z wiekiem osobnika.

Hiperplazja

Zwiększenie rozmiarów i masy tkanki zachodzące na skutek wzrostu liczby podziałów komórkowych (proliferacji komórek).

Hipertrofia

Zwiększenie się rozmiarów komórek prowadzące na ogół do wzrostu masy i rozmiarów tkanki/narządu.

Akrecja

Zwiększenie rozmiarów i masy tkanki wywołane wzrostem masy substancji międzykomórkowej.

Metaplazja

Proces transformacji jednego zróżnicowanego typu komórek w drugi w odpowiedzi adaptacyjnej na chroniczne podrażnienie patogenem lub karcynogenem. Do metaplazji dochodzi w wyniku regeneracji tkanek albo pod wpływem bodźców środowiskowych, albo na skutek przewlekłego działania czynników uszkadzających. Zachodząca we wczesnych etapach embriogenezy naturalna metaplazja nosi nazwę transdyferencjacji.

Klonowanie

W inżynierii genetycznej zabiegi prowadzące do otrzymania osobników identycznych pod względem genetycznym zarówno między sobą, jak i z osobnikiem „rodzicielskim". Technika klonowania polega na uzyskiwaniu zarodków w wyniku transplantacji diploidalnych jąder komórek somatycznych pochodzących z organizmu „rodzicielskiego" do pozbawionych jądra komórek jajowych.

Rozwój osobniczy organizmów zwierzęcych, w tym człowieka, rozpoczyna się w chwili zapłodnienia. Powstała z połączenia komórki jajowej z plemnikiem zygota jest pierwszą komórką nowego organizmu. Zapłodnienie inicjuje serię szybko zachodzących po sobie podziałów mitotycznych (bruzdkowanie). Podziały komórek zarodkowych (blastomerów) prowadzą do utworzenia wielokomórkowego zarodka. Następujący po bruzdkowaniu okres gastrulacji jest czasem skoordynowanych migracji komórek. Dzielą się już tylko niektóre komórki, a pozostałe przemieszczają się względem siebie, zajmując nowe pozycje w obrębie zarodka. W czasie gastrulacji wyodrębniają się pierwsze zespoły komórkowe (tkanki). W wyniku złożonych procesów organogenezy powstają poszczególne narządy. Każdą tkankę i narząd tworzy z reguły kilka odmiennych rodzajów komórek. Komórki te mogą znacznie różnić się kształtem, wielkością i sposobem funkcjonowania. Ciąg zdarzeń prowadzący od komórki wyjściowej do wyspecjalizowanych w strukturze i funkcji komórek w dojrzałym organizmie to proces różnicowania (dyferencjacji). Różnicowanie jest procesem wieloetapowym i w swej istocie polega na stopniowym ograniczeniu potencji rozwojowych kolejnych pokoleń komórek i tym samym zdeterminowaniu ich losów w organizmie. Komórki zarodka różnią się stopniem zróżnicowania. Te, które w wyniku podziałów oraz zachodzących zdarzeń różnicowania mają zdolność do wytworzenia wszelkich typów komórek charakterystycznych dla danego organizmu, to **komórki totipotencjalne.** Komórką w 100% totipotencjalną jest zygota. Totipotencjalny charakter mogą zachować również komórki wczesnego zarodka (do czasu, kiedy nie zostaną ostatecznie zdeterminowane ich losy – zob. dalej). Profesor Andrzej Tarkowski (Uniwersytet Warszawski) pokazał, że u ssaków totipotencjalne są blastomery do stadium 8-komórkowego, co jest warunkiem naturalnej bądź sporadycznej **poliembrionii**[1], czyli tworzenia bliźniąt monozygotycznych (jednojajowych). **Komórki pluripotencjalne** mają zdolność do utworzenia wielu, ale już nie wszystkich typów komórkowych. W dalszym etapie specjalizacji powstają **komórki ukierunkowane** oraz **komórki szlaku końcowego różnicowania.** Te ostatnie to komórki o ściśle określonej strukturze i funkcji, niedzielące się lub o ograniczonej zdolności do proliferacji. Przykładem krańcowego zróżnicowania są ssacze erytrocyty. Erytrocyty są komórkami wyspecjalizowanymi w pełnieniu jednej tylko funkcji (przenoszeniu tlenu i dwutlenku węgla). Specjalizacji funkcjonalnej tworzących się czerwonych krwinek towarzyszą nieodwracalne zmiany w strukturze tych komórek (dochodzi m.in. do utraty jądra komórkowego i wielu organelli komórkowych).

Jaki jest mechanizm różnicowania komórek? Jak z jednokomórkowego osobnika, jakim jest zapłodniona komórka jajowa, powstaje złożoność i różnorodność komórkowa dojrzałego organizmu? To pytania, na które stara się odpowiedzieć współczesna biologia rozwoju.

Opisane w tym rozdziale mechanizmy różnicowania przedstawiono u gatunków, u których je poznano. Pamiętać jednak należy, że mechanizmy te dotyczą także rozwoju człowieka.

Stabilność genomu w czasie różnicowania

Mogłoby się wydawać, że do wytworzenia różnorodnych fenotypowo komórek, odmiennych zarówno strukturalnie, jak i funkcjonalnie, dochodzi w wyniku zmian jakościowych i ilościowych

[1] Poliembrionia może być zjawiskiem trwale związanym z biologią rozrodu pewnych gatunków ssaków (np. u szczerbaków z rodzaju *Dasypus*). U zwierząt bezkręgowych naturalna poliembrionia występuje u wielu gatunków pasożytniczych, np u motylicy wątrobowej (*Fasciola hepatica*).

zachodzących w ich genomie. Pamiętać jednak należy, że wszystkie komórki somatyczne naszego organizmu powstały w wyniku podziałów mitotycznych zygoty, blastomerów i kolejnych pokoleń komórek. W czasie każdego z tych podziałów powstały dwie komórki potomne identyczne pod względem genetycznym z komórką macierzystą. Poza nielicznymi wyjątkami, w jądrach wszystkich komórek somatycznych ludzkiego ciała znajduje się więc ten sam zestaw 23 par chromosomów homologicznych, zawierający tę samą informację genetyczną w postaci kilkudziesięciu tysięcy genów. O stabilności genomu w procesie różnicowania można się przekonać na podstawie obserwacji niektórych zjawisk rozwojowych. Jeśli genom nie zmienia się jakościowo, to możliwa jest zmiana programu rozwojowego komórek już zróżnicowanych. Naturalnym przykładem tego typu reorientacji rozwojowej we wczesnych etapach embriogenezy jest dość wyjątkowe zjawisko **transdyferencjacji** (przeróżnicowania) (zob. metaplazja). Zjawisko transdyferencjacji obserwuje się zarówno u bezkręgowców, jak i u kręgowców. Do zmian fenotypu komórkowego dochodzi na przykład w hodowanych komórkach embrionalnych siatkówki kury. Pod wpływem bodźców środowiskowych występujące w siatkówce pigmentowane komórki nabłonkowe rozpoczynają syntezę krystalin, białek charakterystycznych dla komórek soczewki oka. U ssaków można je obserwować w doświadczeniach *in vitro*. Gdy z hodowli chromochłonnych komórek rdzenia nadnerczy usunie się glikokortykoidy, a wprowadzi peptydowy czynnik wzrostu nerwu (NGF), następuje zmiana fenotypu komórkowego. Wydzielnicze komórki chromochłonne przekształcą się w neurony i zamiast adrenaliny będą wydzielać noradrenalinę. Mezenchymalne komórki macierzyste szpiku kostnego różnicują się w typowe komórki mezodermalne: chondrocyty, osteocyty, adipocyty, komórki mięśniowe. Traktowane odpowiednimi czynnikami wzrostowymi mogą się jednak również różnicować w kierunku hepatocytów, komórek nabłonka jelit, keratynocytów czy też neuronów. Transdyferencjacja występuje również w przypadku **regeneracji narządów**. U ssaków do regeneracji narządów dochodzi rzadko. Narządem o dużym potencjale regeneracyjnym jest wątroba (zob. podrozdz. *Odnowa i przebudowa tkanek i narządów*). Proces regeneracji tkanek lub narządów bywa regułą w wielu grupach zwierząt bezkręgowych oraz u niższych kręgowców, np. u płazów ogoniastych. Amputacja kończyny traszki powoduje, że pozostałe, zróżnicowane już elementy tkanki mięśniowej i łącznej przekształcają się w populację komórek „odróżnicowanych" (blastema), z których zostanie odtworzona „nowa", w pełni sprawna kończyna. Dowodów stabilności genomu w czasie różnicowania dostarczają również wyniki licznych doświadczeń. Indukowana *in vitro* (np. działaniem wirusów lub substancji chemicznych) fuzja komórek somatycznych należących do odrębnych, zróżnicowanych linii komórkowych może doprowadzić do ich funkcjonalnej reorientacji, np. ludzkie hepatocyty poddane fuzji z mioblastami (komórkami miogennymi) rozpoczynają syntezę białek swoistych dla tkanki mięśniowej. Zjawisko transdyferencjacji obserwuje się w badaniach, podczas których zróżnicowane komórki, np. fibroblastów mysich, przekształcają się w neurony, kardiomiocyty czy hepatocyty na skutek aktywacji nadekspresji genów aktywnych w tych liniach komórkowych i zahamowania aktywności niektórych genów aktywnych w komórkach fibroblastów.

Najlepszym dowodem jakościowej identyczności genetycznej zróżnicowanych komórek są niewątpliwie wyniki badań nad przeszczepem jąder komórkowych i klonowaniem. Nagroda Nobla w 2012 roku dla J.B. Gurdona za sklonowanie żaby (1962 r.) przez zastąpienie jądra komórki jajowej płaza jądrem pobranym z komórki nabłonka jelitowego kijanki podkreśliła znaczenie tych badań.

Powstałe w wyniku **klonowania** organizmy są identyczne genetycznie z organizmami, z których pozyskiwano jądra do transplantacji. Poza uzyskaniem możliwości wykorzystania praktycznego (np. w hodowli lub medycynie), wielkim osiągnięciem techniki klonowania organizmów zwierzęcych było wykazanie, że w jądrze komórki zróżnicowanej jest zawarta cała informacja genetyczna potrzebna w procesach rozwojowych do utworzenia wszystkich typów komórek nowego organizmu. Obserwacje procesów rozwojowych i przytoczone eksperymenty udowadniają, że w procesie różnicowania nie dochodzi zasadniczo do żadnych zmian w strukturze genomu.

Od opisanej wyżej reguły stabilności genomu w czasie różnicowania istnieją wyjątki. Znane są sytuacje, w których specjalizacji rozwojowej komórki towarzyszą zmiany ilościowe i jakościowe jej genomu. W procesie różnicowania może nastąpić na przykład **poliploidyzacja genomu**, tj. zwielokrotnienie podstawowego zestawu chromosomów. W porównaniu z komórkami diploidalnymi komórki poliploidalne są z reguły większe, a ze względu na wielokrotną liczbę genów zachodzące w nich procesy transkrypcji mogą przebiegać ze

zwiększoną intensywnością. Do zmian ilościowych związanych ze swoistym namnożeniem genów w komórce można zaliczyć również **proces amplifikacji**. Proces ten polega na selektywnej replikacji tylko wybranych genów. Przykładem amplifikacji może być wewnątrzchromosomowe zwielokrotnienie liczby genów, jakie występuje w somatycznych komórkach folikularnych w jajniku *Drosophila*. Zamplifikowane geny zawierają informację o syntetyzowanych przez te komórki białkach, tworzących osłony jajowe. W komórkach ssaczych amplifikacja protoonkogenów[2] jest jedną z form ich aktywacji i może prowadzić do transformacji nowotworowej. Poza zwielokrotnieniem całości bądź części genomu w pewnych wyjątkowych sytuacjach może nastąpić uszczuplenie informacji genetycznej w komórce. Podczas rozwoju pewnych obleńców (np. glisty świńskiej, *Ascaris suum*) występuje tzw. **dyminucja chromatyny**. W powstających komórkach somatycznych są degradowane znaczne części genomu. Do dyminucji nie dochodzi oczywiście w komórkach linii płciowej, które zachowują całość charakterystycznego dla gatunku zestawu genów. Podobne zjawisko utraty genów w czasie różnicowania polega na eliminowaniu całych chromosomów, np. w rozwoju niektórych owadów. Zawartość genomu może zostać zwiększona bądź zmniejszona. Genom może też ulec strukturalnej reorganizacji. W limfocytach ssaków może dochodzić do delecji fragmentów genów immunoglobulinowych i reorganizacji genetycznej związanej z wytwarzaniem przeciwciał. Reorganizacja genomu limfocytów ma charakter nieodwracalny i przyczynia się do niezwykłej różnorodności wytwarzanych immunoglobulin.

Zróżnicowana ekspresja genów – podstawa specjalizacji strukturalnej i funkcjonalnej komórek

Przedstawione wyżej przykłady zmian genetycznych towarzyszących różnicowaniu należą jednak do wyjątków. Jeśli więc regułą jest stabilność ilościowa i jakościowa genomu, a różnicujące komórki są genetycznie identyczne, to przyczyną specjalizacji strukturalno-funkcjonalnej komórek w czasie różnicowania jest odmienna aktywność genów w tych komórkach, będąca wynikiem **modyfikacji epigenetycznych**. W poszczególnych typach komórek zróżnicowanych większość genów ulega czasowej bądź trwałej represji, a tylko nieliczne pozostają aktywne transkrypcyjnie. Komórki zróżnicowane różnią się **wzorem ekspresji genów**. Charakterystyczny dla danej linii komórkowej wzór ekspresji genetycznej warunkuje powstanie takiego, a nie innego zestawu białek enzymatycznych i strukturalnych, określając tym samym charakter fenotypu komórkowego. Analiza procesów różnicowania komórek pozwala na wyróżnienie w każdej komórce dwóch klas genów. Pierwsze to geny, od których działania zależy przebieg podstawowych procesów metabolicznych w komórce. Bez aktywności tej klasy genów procesy życiowe zostają zahamowane, toteż geny te ulegają ekspresji we wszystkich komórkach organizmu, bez względu na stopień i charakter ich zróżnicowania. Do genów podstawowego metabolizmu należy np. gen dehydrogenazy bursztynianowej, jednego z głównych enzymów zaangażowanych w procesy oddychania komórkowego. Drugą klasę tworzą geny, których ekspresja warunkuje powstanie białek (cech) charakterystycznych jedynie dla danego typu komórki. Geny te ulegają transkrypcji w jednych komórkach, a represji w innych. Z około kilkudziesięciu tysięcy genów zawartych w jądrze każdej komórki ludzkiego ciała tylko niewielka część ulega ekspresji. Każda klasa zróżnicowanych komórek „korzysta" z innego zestawu genów, wytwarzając swoiste dla siebie białka enzymatyczne i strukturalne. W ten sposób tworzące się czerwone krwinki produkują globiny, komórki nerwowe syntetyzują neuroprzekaźniki, a komórki pęcherzykowe trzustki wydzielają enzymy trawienne, np. trypsynę. Wspomniane komórki trzustki mają w swych jądrach zarówno geny globinowe, jak i te kodujące neuroprzekaźniki, ale geny te nie ulegają ekspresji, zachodzi natomiast intensywna transkrypcja genów trypsynowych. Odwrotnie, w jądrze komórki nerwowej dochodzi do ekspresji genów kodujących neuroprzekaźniki, a obecne w jej genomie geny trypsynowe i globinowe pozostają nieaktywne.

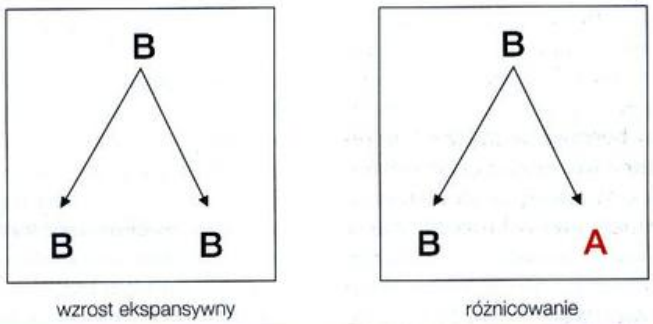
W czasie rozwoju i różnicowania wzór ekspresji genów w komórce może się zmieniać. W pewnych sytuacjach zmianom aktywności genów mogą towarzyszyć wyraźne przekształcenia struktury chromatyny polegające na czasowej kondensacji lub dekondensacji poszczególnych regionów chromosomów. W szczególnych sytuacjach (np. w przypadku tzw. chromosomów olbrzymich – politenicznych) analiza zmian organizacji przestrzennej chromosomów pozwala w stosunkowo prosty sposób obserwować pojawianie się nowych wzorów ekspresji genów w cyklu komórkowym.

[2] Protoonkogeny – grupa genów kontrolujących wzrost i podział komórki. Ich mutacje, translokacje lub zwielokrotnienie (amplifikacja) w genomie przyczyniają się do transformacji nowotworowej (rozdz. 13).

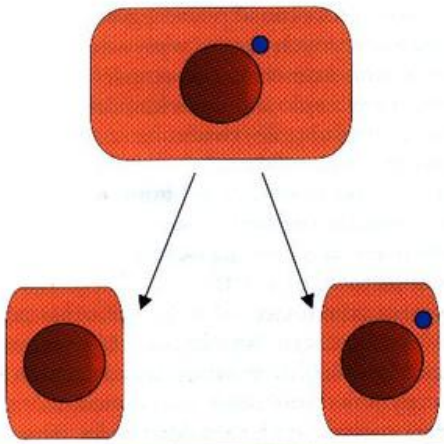
Co jest przyczyną zróżnicowanej ekspresji genów? Dlaczego w jednej komórce informacja zawarta w genie jest wykorzystywana do syntezy funkcjonalnego białka, podczas gdy komórka innego typu z tej informacji w ogóle nie korzysta? Do regulacji funkcji genu dochodzić może na wszystkich poziomach jego ekspresji. W zależności od stopnia metylacji DNA w jądrach komórkowych może pojawić się aktywacja lub inhibicja transkrypcji genów. Następnie może dojść do selektywnego dojrzewania zsyntetyzowanego już RNA (zob. rozdz. 1). W procesie dojrzewania RNA powstaje funkcjonalna cząsteczka mRNA, która zostaje przetransportowana do cytoplazmy i tam pełni rolę matrycy w procesie translacji (syntezy białka). Regulacja funkcji genów może odbywać się również w zaawansowanych etapach ich ekspresji, tj. w czasie syntezy białka lub jego potranslacyjnej modyfikacji. Niektóre geny mogą podlegać regulacji na każdym z wyżej wymienionych poziomów (np. geny globinowe). Z licznych badań wynika jednak, że najczęściej regulacja ekspresji genu występuje na poziomie transkrypcji, a bezpośrednimi „sprawcami" aktywacji bądź represji genów są tzw. **czynniki transkrypcyjne**. Charakterystyczny dla danej komórki wzór ekspresji genów zależy przede wszystkim od obecności i aktywności odpowiednich regulatorów transkrypcji (czynników transkrypcyjnych). W jądrze komórki pęcherzykowej trzustki znajdują się aktywne czynniki transkrypcyjne, których obecność pozwala na „włączenie" transkrypcji genu trypsynowego. Nie ma natomiast czynników, które zezwalałyby na ekspresję genów kodujących neuroprzekaźniki. Sytuacja w jądrze komórki nerwowej przedstawia się odwrotnie.

W jaki sposób dochodzi do uaktywnienia odpowiednich czynników transkrypcyjnych w jednej komórce, a innych w drugiej – to podstawowe zagadnienie dotyczące mechanizmów różnicowania. Aby je zrozumieć, należy cofnąć się w analizie różnicowania komórek do pierwszych etapów rozwoju zarodkowego. Komórki jajowe należą do największych komórek organizmów zwierzęcych. Powstająca w wyniku zapłodnienia komórki jajowej zygota dzieli się wielokrotnie w czasie bruzdkowania, tworząc coraz liczniejsze blastomery. W tym czasie całkowita masa powstającego zarodka nie wzrasta. Materiał cytoplazmy komórki jajowej (ooplazmy) zostaje „rozdysponowany" między pojawiające się w kolejnych cyklach podziałowych blastomery. U wielu gatunków zwierząt rozmieszczenie struktur cytoplazmatycznych i substancji w ooplazmie nie jest równomierne. Podziały bruzdkowania przyczyniają się do segregacji poszczególnych regionów cytoplazmy jaja do różnych blastomerów. Pojawiające się pierwsze różnice między blastomerami dotyczą zawartości ich cytoplazmy. Wprawdzie w wyniku podziałów mitotycznych bruzdkowania powstają identyczne pod względem genetycznym komórki potomne, to jednak ze względu na skład cytoplazmy komórek potomnych podziały te mogą mieć charakter asymetryczny (ryc. 5.1–3). Już od ponad stu lat wiadomo, że zawarte w pewnych regionach ooplazmy substancje mogą wpływać na zachowanie tworzących się z nich blastomerów, determinując ich przyszłe losy. Substancje te to tzw. **determinanty ooplazmatyczne**. Zarówno w prowadzonych obserwacjach kolejnych etapów rozwoju, jak i w badaniach eksperymentalnych wykazano, że obecność poszczególnych regionów cytoplazmatycznych może wpływać na kierunek różnicowania komórek. Obecność tzw. żółtego półksiężyca w zapłodnionych komórkach jajowych osłonic powoduje, że tworzone z tej części jaja blastomery będą miały zdolność do różnicowania w tkankę mięśniową. Z biegunowo położonego w jaju owada regionu zawierającego strukturę cytoplazmatyczną, zwaną oosomem, formują się komórki płciowe (ryc. 5.4).

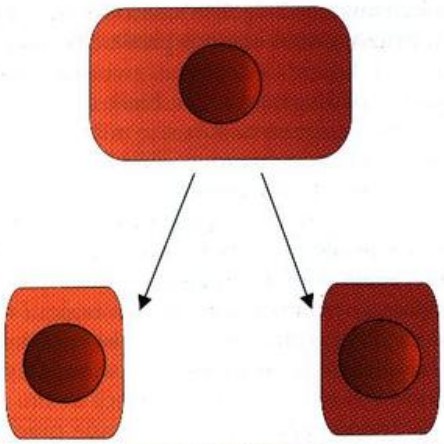
Czym są znajdujące się w cytoplazmie jaja i segregowane w czasie bruzdkowania determinanty ooplazmatyczne? Już w latach trzydziestych XX w. na to pytanie próbował odpowiedzieć twórca chromosomowej teorii dziedziczności, Thomas H. Morgan. Twierdził, że mogą to być substancje, które aktywują swoiste geny jedynie w określonych obszarach zarodka. Białkowe czynniki transkrypcyjne okazały się najlepszymi kandydatami do pełnienia roli zlokalizowanych determinantów rozwojowych. Jak stwierdzono w badaniach prowadzonych w ciągu ostatnich kilkudziesięciu lat, swoistej lokalizacji w komórce podlegają nie tyle białkowe regulatory transkrypcji, co raczej kodujące je mRNA. Degradacja RNA (np. przez naświetlanie UV lub działanie RNazy) w wydzielonych rejonach cytoplazmy jaja doprowadza z reguły do głębokich deformacji rozwojowych, np. celowane zniszczenie RNA w przednim biegunie komórki jajowej owada powoduje zaburzenia w tworzeniu przednich regionów ciała zarodka. Stosując metody genetyki molekularnej oraz lokalizacji określonych sekwencji kwasów nukleinowych techniką hybrydyzacji *in situ* wykazano, że zdeponowany w cytoplazmie przedniego bieguna komórki jajowej *Drosophila* mRNA jest produktem transkrypcji **homeotycznego genu** *bicoid*. W pierwszych etapach rozwoju zarodkowego



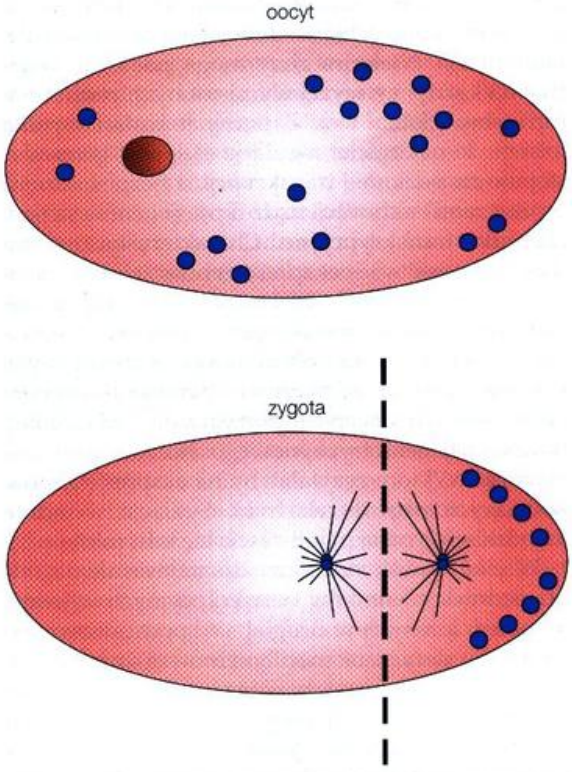
Rycina 5.1 Symetryczny i asymetryczny podział komórki. Podział mitotyczny komórki ma charakter symetryczny, gdy dwie powstające komórki potomne są pod każdym względem identyczne. Asymetria podziału mitotycznego występuje wtedy, gdy powstające komórki różnią się „jakością" rozdzielanej cytoplazmy.



Rycina 5.2 Asymetryczny podział komórki. Różnice „jakościowe" dotyczyć mogą obecności zlokalizowanego determinanta (kolor niebieski).



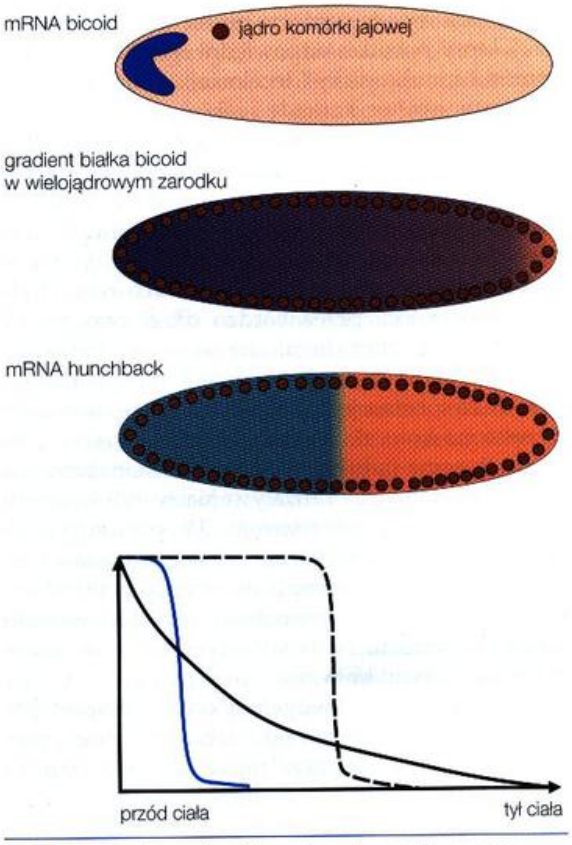
Rycina 5.3 Asymetryczny podział komórki. Różnice „jakościowe" mogą dotyczyć stężenia determinanta, gdy jego rozmieszczenie jest gradientowe.



Rycina 5.4 Klasyczny przykład asymetrii podziału komórkowego związany z determinacją (różnicowaniem) komórek potomnych, np. we wczesnych etapach rozwoju oblenca – *Caenorhabditis elegans*. W cytoplazmie komórki jajowej przed zapłodnieniem znajdują się równomiernie rozmieszczone ziarnistości P (*zaznaczone na niebiesko*). W czasie zapłodnienia zostają one przemieszczone do jednego z biegunów zygoty. W pierwszym podziale bruzdkowania zostają asymetrycznie rozdzielone tylko do jednej z komórek potomnych. W przyszłości potomstwo tej komórki będzie tworzyło populację komórek płciowych, a komórki pozbawione determinanta w postaci ziarnistości P będą się przekształcać w komórki linii somatycznej.

mRNA *bicoid* ulega translacji, a powstałe białko jest czynnikiem transkrypcyjnym zawierającym domenę homeotyczną. Białko bicoid wchodzi do jąder blastomerów powstających z przedniego bieguna komórki jajowej[3]. Jego obecność w jądrze komórkowym aktywuje transkrypcję zygotycznego genu *hunchback*. Komórki tworzącego się zarodka owada zostają więc zróżnicowane na te, w których dochodzi do ekspresji genu *hunchback*, oraz te, w których transkrypcja tego genu nie zachodzi. Z pierwszej grupy komórek będą się tworzyć przednie segmenty ciała owada, z drugiej natomiast struktury budujące jego odwłok (ryc. 5.5). Pierwotne zróżnicowanie komórek zarodkowych zależy od nierównomiernej lokalizacji determinantów (mRNA) w cytoplazmie komórki jajowej oraz od sposobu ich segregacji w asymetrycznych podziałach bruzdkowania. Komórki jajowe różnych grup zwierząt mogą w bardzo istotny sposób różnić się „heterogennością" rozmieszczenia determinantów w cytoplazmie. U niektórych gatunków rozmieszczenie to ma charakter precyzyjnej mapy, tym samym już pierwsze podziały bruzdkowania przyczyniają się do zdeterminowania losów komórek i ich zróżnicowania. Ten typ rozwoju nosi nazwę mozaikowego. Występują też sytuacje odwrotne. Jaja ssaków są „cytoplazmatycznie homogenne", co sprawia, że podziały bruzdkowania są symetryczne. Powstające blastomery do stadium 8-komórkowego pozostają niezróżnicowane i równocenne pod względem potencji rozwojowych (totipotencjalne, zob. wyżej). Rozwój ten ma charakter regulacyjny.

Znaczenie cytoplazmatycznej asymetrii podziałów komórkowych dla procesów różnicowania komórkowego nie jest ograniczone do pierwszych etapów rozwoju zarodkowego. Do asymetrii podziałowej, a w konsekwencji do zróżnicowania powstających komórek dochodzi również w późniejszych etapach embriogenezy oraz u form dorosłych.



Rycina 5.5 Rola determinantów ooplazmatycznych we wczesnych etapach rozwoju na przykładzie produktu genu bicoid w zarodkach *Drosophila*. Dolny wykres przedstawia zmiany stężeń mRNA bicoid (*niebieska linia*), białka bicoid (*linia czarna ciągła*) oraz mRNA hunchback (*linia czarna przerywana*).

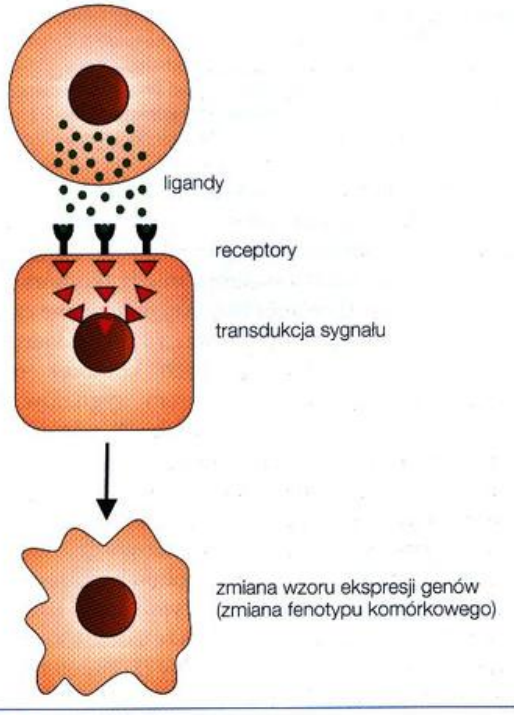
„Dialog międzykomórkowy" w różnicowaniu

Zróżnicowanie pierwszych blastomerów, wynikające z nierównomiernej segregacji determinantów, poza istotnym znaczeniem w ustalaniu ogólnego planu budowy tworzącego się zarodka, czyli wyznaczeniu osi i symetrii ciała, jest podłożem do dalszych etapów bardziej precyzyjnych zdarzeń związanych z determinacją rozwojową komórek. W późniejszych etapach embriogenezy, ale i w różnicowaniu komórek dorosłego organizmu główną rolę odgrywają pewne swoiste oddziaływania międzykomórkowe. Są to tzw. **oddziaływania indukcyjne**, zwane często po prostu indukcją. W wyniku indukcji kierunek rozwoju (różnicowania) jednych komórek może zostać zmieniony pod wpływem sygnałów pochodzących z komórek sąsiednich. W odróżnieniu od innych form sygnalizacji międzykomórkowej (np. sygnalizacji endokrynnej za pomocą hormonów), oddziaływania indukcyjne mają bardzo niewielki zasięg. Stężenie substancji sygnałowych (tzw. **induktorów**, zwanych również ogólnie ligandami) jest niskie. Ponadto potencje indukcyjne, czyli zdolność do wytwarzania ligandów, a także zdolność do odpowiedzi na obecność induktorów (kompetencja) to zjawiska krótkotrwałe. Różne zdarzenia indukcyjne mają zwykle bardzo podobny przebieg: komórka

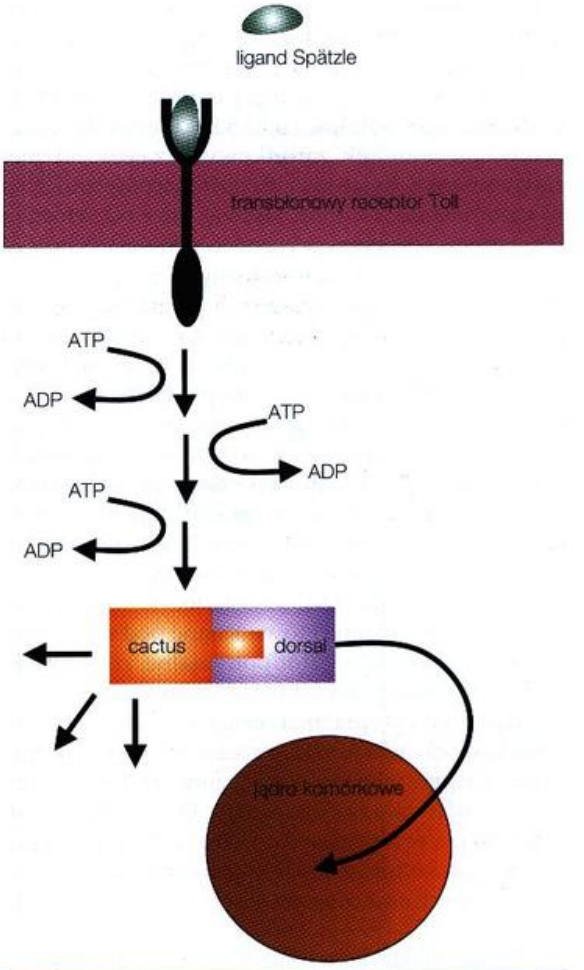
[3] Podobnie jak u innych owadów, w początkowych etapach bruzdkowania *Drosophila* dzielą się jedynie jądra komórkowe, które pozostają we wspólnej cytoplazmie jaja, zajmując w niej pozycję powierzchniową (tzw. bruzdkowanie powierzchniowe).

indukująca wysyła sygnał w postaci ligandu (induktora), który pobudza odpowiedni receptor w błonie komórki indukowanej (docelowej). Pobudzenie receptora wywołuje kaskadę reakcji cytoplazmatycznych. Wynikiem tych reakcji jest uaktywnienie czynnika transkrypcyjnego, który wpływa na zmianę dotychczasowego wzoru ekspresji genów w jądrze komórki indukowanej, wyznaczając tym samym nowy kierunek jej różnicowania (ryc. 5.6). Mimo że rola indukcji w procesach rozwojowych znana była od dziesięcioleci, przez bardzo długi czas trwały badania nad naturą chemiczną substancji indukujących. Szczególnym utrudnieniem w tych badaniach było to, że substancje te działają w niskich stężeniach i często na komórki w najbliższym otoczeniu. Ponadto te same induktory mogą być zaangażowane w bardzo różnych oddziaływaniach indukcyjnych na różnych etapach rozwoju. W prowadzonych ostatnio badaniach wykazano, że wiele substancji indukujących ma charakter białkowy lub peptydowy. Należą do nich tzw. **peptydowe czynniki wzrostu** (czynniki wzrostu fibroblastów – FGF oraz transformujące czynniki wzrostowe typu β – TGF-β), **peptydy z rodziny hedgehog** oraz **glikoproteidy Wnt**. Najlepiej poznano oddziaływania międzykomórkowe, w których uczestniczą czynniki wzrostu (zob. rozdz. 10). Przykładem sygnalizacji indukcyjnej może być również ciąg zdarzeń prowadzący do determinacji osi grzbietobrzusznej w zarodkach *Drosophila* albo proces pobudzania proliferacji i różnicowania limfocytów przez interleukiny (ryc. 5.7).

Duże znaczenie dla procesów różnicowania komórek w układach tkankowych i tworzenia złożo-

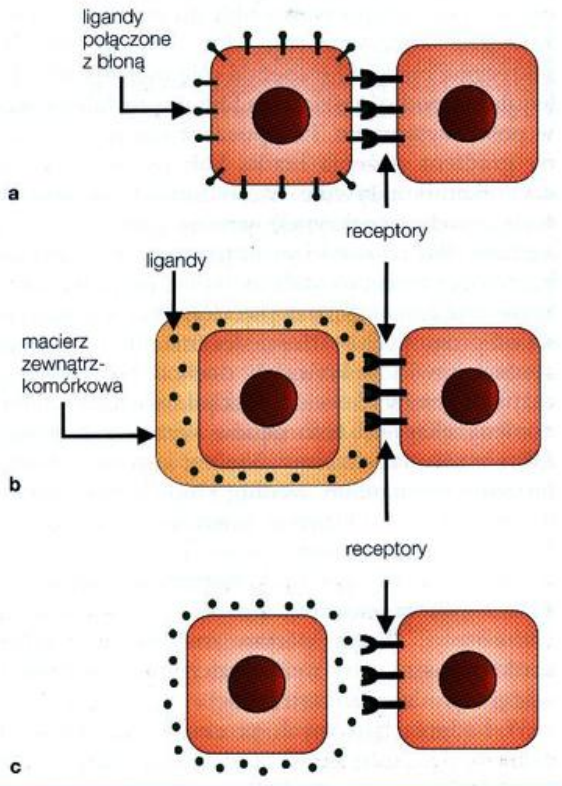


Rycina 5.6 Oddziaływania indukcyjne.



Rycina 5.7 Schemat oddziaływań indukcyjnych prowadzący do determinacji osi grzbieto-brzusznej w zarodkach *Drosophila*. Tkwiący w błonie receptor Toll zostaje pobudzony ligandem Spätzle. Aktywacja Toll powoduje kaskadę fosforylacji w cytoplazmie wielojądrowego zarodka, co prowadzi do rozpadu kompleksu białkowego cactus-dorsal. Białko cactus zostaje zdegradowane, a uwolniony z kompleksu czynnik transkrypcyjny dorsal wędruje do jądra komórkowego, gdzie wpływa na ekspresję genów odpowiedzialnych za ustalenie osi grzbietobrzusznej tworzącego się zarodka. W podobny sposób odbywa się pobudzenie ssaczych limfocytów do wytwarzania immunoglobulin. Odpowiednikiem liganda Spätzle jest interleukina. W wyniku fosforylacji jest degradowane białko IκB, a z kompleksu zostaje uwolniony czynnik transkrypcyjny NFκB.

nej struktury narządów ma sposób przekazywania sygnału indukcyjnego. Wytwarzany przez komórkę indukcyjną ligand może pozostawać związany z jej błoną komórkową (ryc. 5.8a). Wtedy proces indukcji wymaga bezpośredniego kontaktu komórki indukującej z indukowaną. Ligand indukcyjny może być zakotwiczony w macierzy zewnątrzkomórkowej (ryc. 5.8b) bądź też zostaje wydzielony do środowiska zewnątrzkomórkowego, gdzie dyfunduje w obrębie najbliższego sąsiedztwa komórki indukującej (tego rodzaju wydzielanie nosi nazwę sekrecji parakrynnej) (ryc. 5.8c). Wydzielany i dyfundujący z miejsca sekrecji ligand indukcyjny może jednocześnie podlegać powolnej degradacji. Wówczas w środowisku komórek sąsiadujących z miejscem sekrecji ligandu („centrum sygnalizacyjnym") tworzyć się będzie gradient stężenia substancji indukującej. Komórki znajdujące się w różnej odległości od miejsca sekrecji ligandu będą eksponowane na różne jego stężenia. Łagodny gradient sygnału indukcyjnego może spowodować różną, zależną od progowych wartości stężeń, odpowiedź komórek indukowanych. Substancje indukujące, których efekt działania indukcyjnego w procesach różnicowania komórek sąsiadujących zależy od gradientu ich stężenia w środowisku zewnątrzkomórkowym, noszą nazwę **morfogenów**. Działaniu morfogenów przypisuje się obecnie kluczową rolę w złożonych procesach różnicowania w układach wielokomórkowych. Zdolność do odmiennych odpowiedzi na różne stężenia morfogenów powoduje, że w wyniku ich działania w populacji identycznych komórek może pojawić się jednocześnie wiele różnych typów komórek zróżnicowanych. Pamiętać jednak należy, że w rzeczywistych układach tkankowych sytuacje są znacznie bardziej złożone. Na zespół tkankowy działać może jednocześnie (bądź kolejno) wiele morfogenów o różnym gradiencie i mechanizmie działania. Komórki w tkance poddanej działaniu morfogenów mogą być odpowiednio predeterminowane na odbiór bodźców indukcyjnych. Utrudnieniem jest także to, że zjawiska indukcyjne mają często charakter kaskadowy. Oznacza to, że wynikiem indukcji może być przekształcenie komórek indukowanych w nowe centrum sygnalizacji międzykomórkowej, a dotychczasowa komórka indukująca może stać się komórką podatną na bodziec indukcyjny.



Rycina 5.8 Różne mechanizmy przekazywania sygnału indukcyjnego: **a.** ligand pozostaje związany z błoną komórki indukującej, **b.** ligand zakotwiczony w macierzy zewnątrzkomórkowej, **c.** dyfuzja liganda w przestrzeni zewnątrzkomórkowej (sekrecja parakrynna).

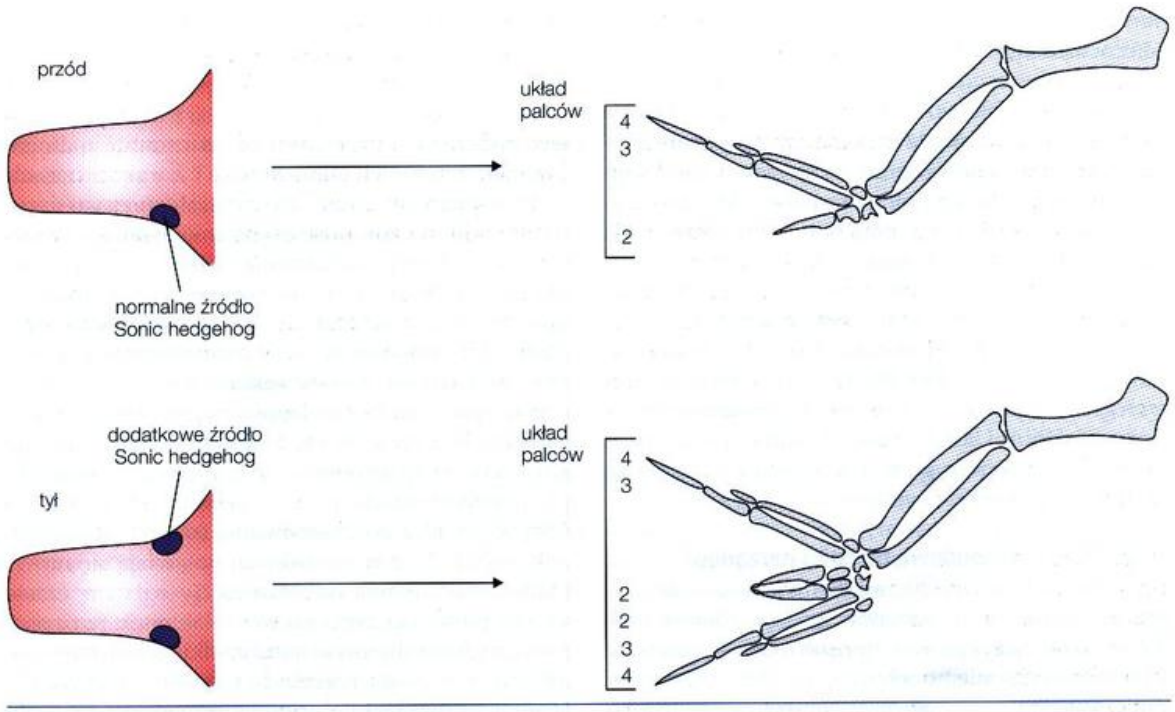
Informacja pozycyjna

Złożony system oddziaływań międzykomórkowych, nakładające się na siebie gradienty morfogenów, zróżnicowanie odpowiedzi na działanie bodźców indukcyjnych oraz tworzenie nowych centrów sygnalizacji powodują, że w niezróżnicowanym początkowo zespole komórkowym może się pojawić przestrzenny „wzór" (ang. *pattern*) rozmieszczenia wyspecjalizowanych strukturalnie i funkcjonalnie komórek. Powstające w czasie organogenezy narządy mogą być zbudowane z tych samych tkanek. Różnią się jednak „wzorem" ich przestrzennej organizacji. Teorie opisujące ogólne mechanizmy tworzenia „wzorów" (ang. *pattern formation*) zakładają, że komórki tworzące niezróżnicowane morfologicznie zawiązki organów „znają" swoje położenie w tkance i potrafią je „zinterpretować", różnicując w tym lub innym kierunku. Koncepcję **informacji pozycyjnej** do analizy procesów morfogenetycznych wprowadził w latach siedemdziesiątych XX w. Lewis Wolpert. W owym czasie koncepcja ta miała charakter raczej teoretyczny, a o molekularnych podstawach „tworzenia wzorów" nie wiedziano prawie nic. Badania

eksperymentalne z zastosowaniem technik inżynierii genetycznej oraz genetyki molekularnej zdają się potwierdzać koncepcję Wolperta. Ze względu na stałą możliwość kontroli rozwoju zarodka i tym samym dokonywania manipulacji embriologicznych lub genetycznych, dogodnym modelem do badania złożonych procesów różnicowania komórek w czasie tworzenia narządów okazały się kończyny ptaków. Zawiązki tworzących się kończyn to położone bocznie w stosunku do długiej osi ciała zarodka niewielkie wzgórki niezróżnicowanej morfologicznie tkanki mezenchymatycznej (zarodkowa tkanka łączna) pokryte nabłonkiem ektodermalnym. Z przeprowadzonych obserwacji wynika, że już we wczesnych etapach rozwoju (na długo przed stadium zróżnicowania morfologicznego) w obrębie zawiązka kończyny są wyznaczone osie i płaszczyzny symetrii powstającego narządu. Tworzące zawiązek kończyny komórki „wiedzą", jaką pozycję zajmują względem osi przednio-tylnej lub grzbietobrzusznej. Właściwa „interpretacja" informacji pozycyjnej, np. w osi przód–tył powoduje, że z komórek położonych w przedniej części zawiązka kończyny rozwijać się będzie palec 2, a z komórek znajdujących się w tylnej strefie zawiązka palec 4 (w przedniej kończynie u ptaków palce 1 i 5 są zredukowane). Tworzenie informacji pozycyjnej zależy od sygnalizacji międzykomórkowej (oddziaływań indukcyjnych). Z doświadczeń polegających m. in. na przeszczepianiu grup komórek w obrębie narządu, wynika, że w tylnej strefie zawiązka kończyny znajduje się grupa komórek mezenchymatycznych pełniąca funkcję centrum sygnalizacji przednio-tylnej (tzw. strefa aktywności polaryzacyjnej). Wydaje się, że komórki te wydzielają dyfundujący ligand-morfogen. Malejący w kierunku przednim gradient stężenia morfogenu indukuje komórki mezenchymatyczne do utworzenia palców właściwych dla danego regionu kończyny. Komórki znajdujące się w niskim stężeniu morfogenu (strefa przednia zawiązka kończyny) formować będą palec 2, podczas gdy z komórek poddanych działaniu stężeń najwyższych (strefa tylna) powstawać będzie palec 4. Badania molekularne prowadzone w drugiej połowie lat dziewięćdziesiątych XX w. pozwoliły przynajmniej po części zidentyfikować geny i ich białkowe produkty, które są zaangażowane w tworzenie „wzoru" formowania palców w osi przednio-tylnej. Okazało się, że w komórkach tworzących strefę aktywności polaryzacyjnej dochodzi do ekspresji genu *sonic hedgehog* (*shh*). Białko sonic hedgehog (Shh) jest białkiem sekrecyjnym i należy do rodziny peptydów sygnałowych hedgehog (gen i białko hedgehog odkryto pierwotnie w zarodkach *Drosophila*, u kręgowców stwierdzono obecność trzech jego homologów: *desert hedgehog*, *indian hedgehog* i *sonic hedgehog*). Aktywność tych genów jest związana z procesami różnicowania komórek i tkanek w różnych etapach rozwoju zarodkowego.

Powstające w strefie aktywności polaryzacyjnej białko Shh ma zdolność do polaryzowania zawiązka powstającej kończyny w osi przednio-tylnej. Wykazano to w serii doświadczeń. Hodowane *in vitro* fibroblasty kurczęcia „zmuszono" technikami inżynierii genetycznej do ekspresji genu *shh*. Następnie komórki te wszczepiono do przedniego regionu zawiązka kończyny. Zabieg ten spowodował powstanie zdeformowanych kończyn. Deformacja polegała na odwróceniu polaryzacji przednio-tylnej. Jednoczesna obecność w tylnej strefie zawiązka kończyny właściwej strefy aktywności polaryzacyjnej przyczyniła się do utworzenia kończyny o zduplikowanym i symetrycznym wzorze ułożenia palców. Identyczny efekt uzyskano również w doświadczeniach polegających na wprowadzaniu oczyszczonego białka Shh do strefy przedniej zawiązka kończyny (ryc. 5.9). Wydaje sie, że sekrecyjne białko Shh spełnia rolę morfogenu. Molekularne podłoże działania Shh nie zostało jeszcze w pełni wyjaśnione. Przypuszcza się, że utworzony gradient stężenia białka Shh (wraz z innymi czynnikami) aktywuje w komórkach mezenchymatycznych transkrypcję genów homeotycznych z grupy *Hox* (*Hox a* i *Hox d*) (na matrycach genów homeotycznych powstają białkowe czynniki transkrypcyjne zawierające homeodomeny). W zależności od progowych wartości stężenia Shh w różnych strefach zawiązka kończyny dochodzi do ekspresji różnych genów *Hox a* i *d*. Nakładające się na siebie domeny ekspresji tych genów wyznaczają precyzyjny wzór przestrzenny. Nie jest jeszcze do końca poznany mechanizm, według którego zróżnicowana terytorialnie ekspresja poszczególnych genów *Hox* kontroluje sposób zachowania się komórek w obrębie tworzącej się kończyny. Wiadomo, że zróżnicowanie ekspresji genów tworzy podłoże „informacyjne", na którym zostają wytworzone konkretne struktury morfologiczne o zdeterminowanej organizacji przestrzennej.

W badaniach różnych procesów rozwojowych okazało się, że te same cząsteczki zaangażowane w sygnalizację międzykomórkową lub regulację funkcji genów mogą być wykorzystane w niezależnych od siebie zdarzeniach związanych z różnicowaniem komórek i tkanek. Wspomniane wyżej sygnalizacyjne białko Shh jest dobrym przy-



Rycina 5.9 Udział genomu Sonic hedgehog w rozwoju kończyny kury. Prawidłowo gen Sonic hedgehog ulega ekspresji w grupie komórek na tylnej stronie zawiązka kończyny; wprowadzone sztucznie na przednią stronę pączka skrzydłowego dodatkowe źródło Sonic hedgehog wywołuje lustrzane podwojenie układu palców (wg B. Alberts i wsp.).

kładem tego typu cząsteczki. Bierze udział nie tylko w polaryzacji morfogenetycznej tworzących się kończyn, ale również wpływa na determinację pewnych struktur w obrębie ośrodkowego układu nerwowego lub reguluje prawidłowe funkcjonowanie komórek nabłonkowych tworzących mieszki włosowe w skórze. Zaburzenia w sygnalizacji międzykomórkowej zależnej od działania Shh prowadzą do powstawania poważnych deformacji rozwojowych (np. cyklopia, zespół Pallistera-Halla), a także do rozwoju procesów nowotworowych (rak podstawnokomórkowy skóry).

Pamięć komórkowa

W końcowych etapach embriogenezy ciało zarodka buduje wiele różnych typów zróżnicowanych komórek, których zespoły (tkanki) tworzą strukturę wszystkich wyodrębnionych już narządów. Proces różnicowania komórek zachodzący od początkowych etapów rozwoju zarodkowego polega na stopniowym ograniczaniu potencji rozwojowych komórek. Powstały w wyniku zdarzeń różnicowania wzór ekspresji genów, charakterystyczny dla danej linii komórkowej, zostaje zapisany w pamięci komórkowej i jest dziedziczony w kolejnych pokoleniach komórek potomnych. Zachowanie charakterystycznego dla danej linii komórkowej wzoru ekspresji genów może opierać się na kilku mechanizmach. Jednym z nich jest mechanizm pozytywnego sprzężenia zwrotnego, zgodnie z którym produkt danego genu jest czynnikiem transkrypcyjnym aktywującym ten gen. Zdarzeniem inicjującym różnicowanie jest aktywacja transkrypcyjna genu (np. zachodząca w wyniku oddziaływań indukcyjnych). Późniejszy stały stan aktywności podlega wspomnianej samokontroli. Przykładem tego typu sprzężenia zwrotnego mogą być procesy, w wyniku których dochodzi do przekształcenia komórek miogennych we włókna mięśniowe. W procesie tym białkowy produkt genu *myoD* jest aktywatorem ekspresji genu *myoD*. Obecność białka myoD (oraz innych produktów genowych tej rodziny genów) jest warunkiem prawidłowego tworzenia włókien mięśniowych w embriogenezie. Inne mechanizmy utrzymania ustalonych wzorów ekspresji genów polegają na strukturalnych i chemicznych modyfikacjach w obrębie chromosomów i DNA. Zmiany strukturalne polegają na selektywnej kondensacji pewnych regionów chromatyny w heterochromatynę, co przyczynia się do ich dezaktywacji

transkrypcyjnej. Wzory rozmieszczenia obszarów heterochromatyny są charakterystyczne dla danych linii komórkowych i mogą pozostawać nienaruszone nawet po wielu cyklach proliferacyjnych. U kręgowców mogą wystąpić modyfikacje epigenetyczne DNA, które przyczyniają się do utrzymania stanów dezaktywacji poszczególnych genów. Modyfikacje te polegają na metylacji cytozyny we fragmentach CG w określonych odcinkach DNA. Stan metylacji może być zachowany nawet po wielu cyklach replikacji DNA. Swoisty enzym, metylaza DNA, rozpoznaje obecność metylowanej cytozyny i powoduje przyłączenie grup metylowych do odpowiadających grup cytozynowych w nowo syntetyzowanym łańcuchu DNA. Układy z metylowaną cytozyną zostają dziedziczone, a geny je zawierające pozostają nieaktywne transkrypcyjnie.

Odnowa i przebudowa tkanek i narządów

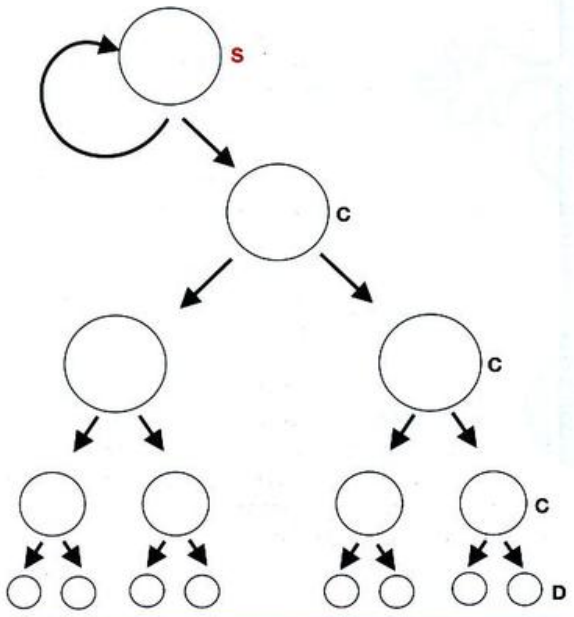
Poza nielicznymi wyjątkami, los większości komórek w dorosłym organizmie zostaje zdeterminowany, a do radykalnych transformacji fenotypów komórkowych nie dochodzi prawie w ogóle. Zmiany orientacji programu rozwojowego (transdyferencjacje) występują jedynie w sytuacjach wyjątkowych. Możliwe są natomiast niewielkie, odwracalne przekształcenia tkankowe zachodzące w obrębie tego samego typu tkankowego. Przekształcenia te noszą nazwę **metaplazji**. Metaplazja w obrębie tkanki nabłonkowej jest uważana za stan przedrakowy, czyli usposabiający do rozwoju raka. Charakterystycznymi przykładami metaplazji są zmiany nabłonka dróg oddechowych (wielorzędowy migawkowy z komórkami kubkowymi) oraz nabłonka szyjki macicy (jednowarstwowy walcowaty wydzielający śluz) w nabłonek wielowarstwowy płaski. Największy zakres zmian kierunków różnicowania dotyczy komórek tkanki łącznej. W zależności od warunków mikrośrodowiskowych pluripotencjalne, intensywnie dzielące się komórki osteogenne mogą różnicować w osteoblasty lub chondroblasty. Jednym ze znanych czynników wyznaczających kierunek różnicowania komórek osteogennych jest m. in. ciśnienie parcjalne tlenu w tkance. Jeśli jest wysokie (np. w bliskim sąsiedztwie kapilarnych naczyń krwionośnych), komórki osteogenne przekształcają się w osteoblasty, co prowadzi do powstawania tkanki kostnej. W niskich wartościach ciśnienia tlenu komórki osteogenne różnicują w chondroblasty. Przy odpowiedniej zmianie warunków środowiskowych, te ostatnie mogą ulegać transformacji w osteoblasty. Największe potencje do zmiany orientacji różnicowania mają fibroblasty, które mogą różnicować się w kilka typów komórek tkanki łącznej.

W organizmie funkcjonują komórki, które osiągnęły stan ostatecznej specjalizacji jeszcze w czasie embriogenezy lub w okresie postembrionalnym. Tworząc trwały element tkanki i narządu, zasadniczo nie zmieniają się w ciągu całego czasu życia organizmu. Tylko niektóre tkanki charakteryzują się taką właśnie stabilnością składu komórkowego. Należą do nich np.: tkanka nerwowa[4], mięśnia sercowego i komórki tworzące soczewkę oka. Mimo determinacji, procesy różnicowania w wielu przypadkach nie zostały zakończone. W dorosłym organizmie tkanki podlegają ciągłej przebudowie i odnowie, a tworzące je komórki mogą różnić się stopniem zróżnicowania. Zróżnicowane komórki po pewnym czasie funkcjonowania giną (najczęściej w wyniku programowanej śmierci, apoptozy, zob. rozdz. 4), a w ich miejscu pojawiają się nowe. Odnowa tkankowa odbywa się w różnym czasie w zależności od typu tkanki. Nabłonek tworzący powierzchnię śluzówki jelita cienkiego odnawia się zaledwie w ciągu tygodnia, komórki trzustki potrzebują natomiast na odnowę ponad rok. W tkankach różnego typu odnowa składu komórkowego może następować w wyniku proliferacji komórek zróżnicowanych, może też wiązać się z obecnością **niezróżnicowanych komórek macierzystych**. Dzięki podziałom hepatocytów jest możliwa częściowa regeneracja tkanki wątrobowej. Proliferacja hepatocytów jest procesem podlegającym kontroli przez nie do końca wyjaśnione, złożone mechanizmy homeostatyczne. Liczba komórek wątrobowych, a co za tym idzie, wielkość całego narządu jest zdeterminowana. Intensywność podziałów hepatocytów może być stymulowana drastycznymi bodźcami, np. intoksykacją tkanki wątrobowej lub zabiegiem chirurgicznym. Na skutek uszkodzenia wątroby w krwiobiegu pojawiają się cząsteczki sygnałowe (czynniki wzrostu hepatocytów), które pobudzają komórki wątrobowe do wzmożonej proliferacji. Zaburzenia w procesach regeneracyjnych tkanki wątrobowej mogą wystąpić w warunkach stałego i przedłużającego się działania substancji toksycznych (np. etanolu). Proliferacja hepatocytów zostaje ograniczona, a miejsce komórek wątrobowych zajmują zasiedlające wątrobę komórki tkanki łącznej (fibroblasty). Wątroba niejako zostaje „zatkana"

[4] Obecność komórek macierzystych neuronów, a także komórek gleju w ośrodkowym układzie nerwowym (zob. dalej) sugeruje, że nawet w tak stabilnej tkance, jaką jest tkanka nerwowa, może odbywać się różnicowanie i regeneracja.

elementami tkanki łącznej i jest fizjologicznie niewydolna (marskość wątroby – *cirrhosis*).

W niektórych tkankach odnowa składu komórkowego ma charakter ciągły i jest możliwa dzięki aktywności niezróżnicowanych komórek macierzystych. U ssaków stałą obecność komórek macierzystych stwierdzono m. in.: w tkankach nabłonkowych, szpiku kostnym, w wątrobie i w ośrodkowym układzie nerwowym. Wyróżnienia komórek macierzystych dokonuje się na podstawie kryteriów funkcjonalnych, przypisując tej klasie komórek wiele różnych atrybutów. Do najważniejszych należą: zdolność do samoodnowy oraz do generowania zróżnicowanego potomstwa. W wyniku asymetrycznego podziału komórki macierzystej może powstać identyczna komórka macierzysta oraz komórka ukierunkowana, która w kolejnych podziałach oraz zachodzących zdarzeniach różnicowania przekształci się w komórkę zróżnicowaną (ryc. 5.10). W czasie symetrycznego podziału komórki macierzystej mogą też powstać dwie takie same komórki macierzyste lub dwie komórki progenitorowe. Innymi markerami komórek macierzystych są: wysoka aktywność telomerazy, ekspresja markerów komórek embrionalnych (oct3/4, nanog), dobrze funkcjonujący aparat usuwania toksyn.



Rycina 5.10 Komórki macierzyste (S) dzieląc się, ulegają samoodnowie. Powstałe niezróżnicowane komórki ukierunkowane (C) proliferują, przyczyniając się do powstania licznego zróżnicowanego potomstwa (D).

Komórki macierzyste hematopoetyczne charakteryzują się ponadto ekspresją antygenów CD34, CD133, SSEA-4, c-kit oraz brakiem antygenów liniowych, takich jak np.: CD38, CD33, CD71 czy CD3.

Rolę komórek macierzystych w procesach odnowy tkankowej poznano najlepiej na przykładzie komórek macierzystych w naskórku, nabłonku śluzówki jelita cienkiego, śródbłonku naczyń krwionośnych oraz krwiotwórczych komórek macierzystych szpiku kostnego.

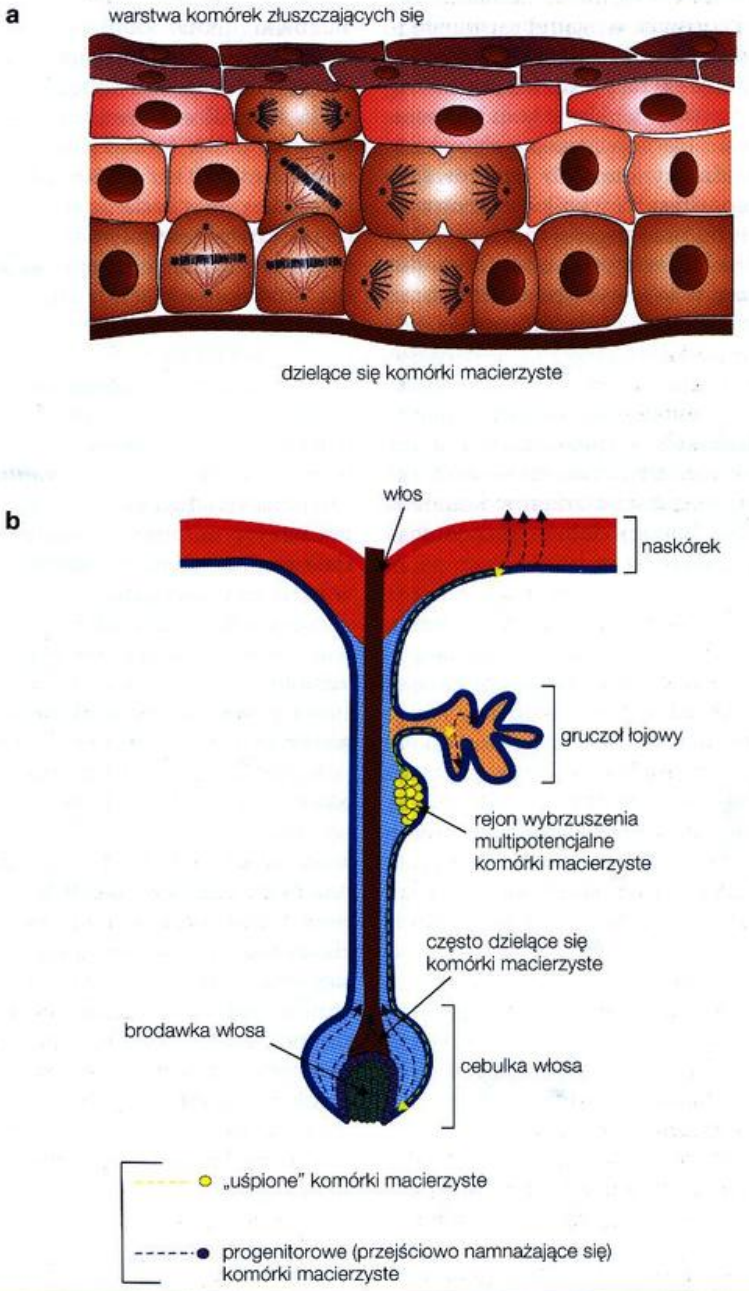
W krwi obwodowej krążą komórki progenitorowe śródbłonka (poniżej 0,01%) charakteryzujce się markerami CD34 i CD309, które zdolne są do tworzenia kolonii w badanich *in vitro* i integracji z naczyniami krwionośnymi w badanich *in vivo*. Komórki te charakteryzuje też ekspresja markerów typowych dla śródbłonka naczyń (np. CD31). Uszkodzenie doświadczalne wewnętrznej warstwy naczyń krwionośnych (*tunica intima*) stymuluje powstanie w niej skupisk komórek śródbłonka intensywnie proliferujących, co sugeruje obecność komórek macierzystych. Komórki macierzyste opisano też w *tunica media* i *tunica adventitia* naczyń. W *tunica adventitia* znajdują się nisze tkankowe z komórkami macierzystymi/progenitorowymi o wysokim potencjale angiogennym. Komórki te mogą uczestniczyć w rozwoju chorób naczyniowych.

Naskórek jest utworzony przez nabłonek zbudowany w większości z tzw. keratynocytów (komórki nabłonka syntetyzujące keratynę – białko włóknistości pośrednich, charakterystycznych dla tkanki nabłonkowej).

Komórki macierzyste znajdują się w warstwie bazalnej nabłonka, w kontakcie z blaszką podstawną. Tuż nad nimi znajduje się warstwa komórek kolczystych, a bliżej powierzchni nabłonka keratynocyty warstwy ziarnistej. Warstwę najbardziej zewnętrzną naskórka tworzy warstwa komórek złuszczających się zbudowana z martwych łusek rogowych. W miąższu naskórka można obserwować strefowy układ komórek o odmiennym stopniu zróżnicowania i dojrzałości[5]. Proliferacja komórek macierzystych w bazalnej warstwie nabłonka przyczynia się do tworzenia nowych keratynocytów i tym samym „uzupełnia" straty wynikające ze złuszczania się warstw powierzchniowych (ryc. 5.11).

[5] W przeciwieństwie do różnicowania, które ma charakter procesu jakościowego, w czasie dojrzewania występują jedynie zmiany ilościowe. W wyniku aktywacji genu (różnicowanie) dochodzić może do postępującego nagromadzenia białka (dojrzewanie).

Komórki macierzyste odpowiedzialne za budowę włosa, regenerację gruczołów łojowych oraz regenerację naskórka znajdują się też w mieszkach włosowych. Powstanie mieszków włosowych jeszcze w pierwszym trymestrze ciąży kontrolowane jest przez białka szlaku sygnalizacyjnego Wnt/β-katenina, a następnie białka Shh. U podstawy mieszka włosa znajduje się brodawka włosa, którą obok fibroblastów zasiedlają mezenchymalne komórki macierzyste. Mezenchymalne komórki



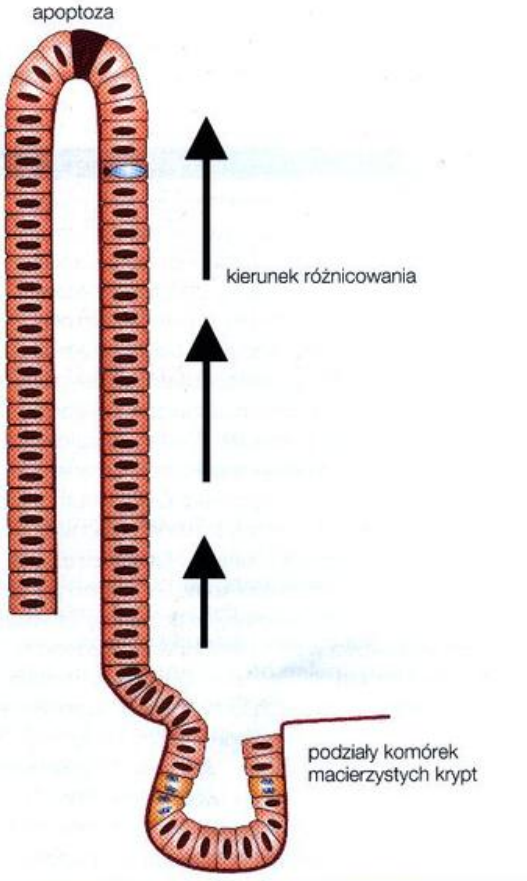
Rycina 5.11 Komórki macierzyste w naskórku i mieszku włosa, odnowa komórek naskórka. Naskórek zaznaczono kolorem czerwonym, torebkę włosa kolorem niebieskim. „Uśpione" komórki macierzyste rejonu wybrzuszenia w razie potrzeby przesuwają się w kierunku brodawki włosa, gruczołu łojowego, naskórka i odnawiają (kolor ciemnoniebieski) komórki progenitorowe.

macierzyste mieszka mogą różnicować się w komórki tłuszczowe, mięśniowe, kostne, hematopoetyczne. Aktywacja szlaku Wnt stymuluje komórki do podziałów i wytwarzania włosa.

Pomiędzy brodawką włosa a gruczołem łojowym znajduje się region przyczepu mięśnia przywłosowego i nisza z epitelialnymi komórkami macierzystymi, które pozostają w stanie „uśpienia". Wyjście komórek z niszy w kierunku brodawki włosa, gruczołu łojowego i naskórka skutkuje przekształceniem tych komórek w dzielące się komórki progenitorowe. W warunkach fizjologicznych w regeneracji naskórka biorą udział komórki warstwy bazalnej, ale w przypadku uszkodzenia naskórek regenerowany jest przez komórki pochodzące bezpośrednio z regionu niszy komórek epitelialnych mieszka włosowego. Komórki te są później zastępowane przez komórki wywodzące się z komórek warstwy bazalnej (ryc 5.11).

Podobną funkcję w odnowie tkankowej pełnią komórki macierzyste w nabłonku jednowarstwowym, np. jaki tworzy powierzchnię śluzówki jelita cienkiego. Jednowarstwowy, pryzmatyczny nabłonek pokrywa kosmki jelitowe, a u ich podstawy wnika w podłoże łącznotkankowe, tworząc charakterystyczne inwaginacje (tzw. krypty jelitowe). Nabłonek tworzą takie komórki, jak: enterocyty, komórki śluzowe, komórki Panetha i komórki enteroendokrynowe. Komórki macierzyste znajdują się w niedalekiej odległości od dna krypty. Ich proliferacja przyczynia się do tworzenia nowych komórek nabłonka. Komórki zróżnicowane po pewnym czasie przechodzą programowaną śmierć i zostają wyrzucone do światła jelita ze szczytowych stref kosmka jelitowego (ryc. 5.12). Podobnie jak w przypadku naskórka, w strukturze nabłonka śluzówki jelita widoczny jest więc „wektor różnicowania" skierowany od głębokich stref krypty jelitowej do szczytu kosmka. Lokalizacja komórek odnawialnych oraz procesy różnicowania komórek potomnych są w przypadku nabłonków uporządkowane przestrzennie, co może mieć istotne znaczenie dla samych procesów różnicowania (czynniki pobudzające proliferację i różnicowanie mogą działać tylko w określonych, zlokalizowanych przestrzennie niszach).

W przeciwieństwie do nabłonków, różnicowanie komórek w układzie krwiotwórczym odbywa się w nieuporządkowanej przestrzennie tkance zewnątrznaczyniowej szpiku kostnego. Jak wykazano, tworzenie całej populacji zróżnicowanych elementów morfotycznych krwi zachodzi w wyniku ciągłej proliferacji krwiotwórczych komórek macierzystych. W eksperymentach polegających



Rycina 5.12 Odnowa komórek nabłonkowych w jelicie cienkim. Komórki zróżnicowane „migrują" od miejsca swego powstania (podziały komórek macierzystych w kryptach) do szczytu kosmka jelitowego, gdzie złuszczają się w wyniku apoptozy.

na destrukcji całego układu krwiotwórczego (np. silnym napromieniowaniem) i jego odtwarzaniu przez iniekcję komórek macierzystych udowodniono, że macierzysta komórka krwiotwórcza w wyniku podziałów i kolejnych etapów różnicowania może odtworzyć różnorodność wszystkich typów komórkowych krwi. W kolejnych stadiach różnicowania komórek potomnych można wyróżnić populację komórek przejściowych (tzw. komórki ukierunkowane), które w przeciwieństwie do komórek macierzystych nie mają zdolności do samoodnawiania się, ale intensywnie proliferują, a ich losy są ograniczone jedynie do jednego kierunku różnicowania. Mogą być np. ukierunkowane erytropoetycznie, a ich końcowym potomstwem będę erytrocyty. Zdarzenia związane z dojrzewaniem, czyli ze zmianami ilościowymi w procesach różnicowania, prowadzą od komórek ukierunkowanych

do prekursorowych. Wyróżnialne morfologicznie komórki prekursorowe przekształcają się w dojrzałe i niezdolne do podziału zróżnicowane komórki krwi.

KLINIKA

Mimo że rola komórek macierzystych w odnowie tkankowej jest zupełnie oczywista, mechanizmy ich funkcjonowania, regulacja podziałów komórek macierzystych lub związane z nią procesy homeostazy tkankowej nie zostały w pełni wyjaśnione. W tkankach funkcjonować musi bardzo dokładny mechanizm kontroli proliferacji i samoodnawiania się komórek macierzystych. Zaburzenia systemu kontrolnego mogą prowadzić do stanów patologicznych. Niewłaściwa proliferacja komórek macierzystych naskórka może doprowadzić do nadprodukcji keratynocytów i ich niekontrolowanego rogowacenia i złuszczania, co obserwuje się w łuszczycy (*psoriasis*). Stan niezróżnicowania komórek macierzystych oraz ich zdolności proliferacyjne powodują, że wiele nieprawidłowości w ich funkcjonowaniu prowadzi do powstawania nowotworów. Obecność komórek macierzystych w różnych typach tkanki nabłonkowej oraz w szpiku kostnym z jednej strony umożliwia ich stałą i dynamiczną odnowę, a z drugiej – powoduje, że wiele różnego typu nowotworów powstaje pierwotnie w tej właśnie tkance. Wykonywane przeszczepy szpiku kostnego polegają na zniszczeniu komórek hematopoetycznych chorego i zastąpieniu ich zdrowymi komórkami pochodzącymi od odpowiedniego dawcy.

Piśmiennictwo

Bielańska-Osuchowska Z.: *Indukcja embrionalna w zarodkach Xenopus laevis – czynniki indukujące*. Post. Biol. Kom. 1998, 25, 3, 439–478.

Biliński S.M.: *Gromadzenie informacji rozwojowej w oocytach Drosophila. Ultrastruktura i funkcja komórki T. 6. Oogeneza*, PWN, 1994, 50–61.

Colloni R., Cordero E.A., Henriques J.A., Bonatto D.: *Reviewing and updating the major molecular markers for stem cells*. Stem. Cells Dev. 2013, 22, 1455–76.

Epstein R.J.: Rozwój. W.: *Biologia molekularna człowieka*, tłum. pol. red. Andrzej Lewiński, Paweł P. Liberski, Wydawnictwo Czelej, Lublin 2005, 405-430.

Ghavifekr Fakhr M., Farshdousti Hagh M., Shanehbandi D., Baradaran B.: *DNA methylation pattern as important epigenetic criterion in cancer*. Genet. Res. Int. 2013, 2013:317569 (doi: 10.1155/2013/317569).

Grafka A., Łopucki M.: *Wykorzystanie komórek macierzystych w medycynie*, Post. Biol. Kom. 39, 2012, 301–315.

Joachimiak R., Bajek A., Drewa T.: *Mieszki włosowe nowym źródłem komórek macierzystych*. Post. Hig. Med. Dośw. 2012, 66, 181–186.

Kaczanowski A., Kaczanowska J.: *Mechanizmy przestrzennego różnicowania zarodka*. Post. Biol. Kom. 2001, 28, 1, 69–98.

Kawiak J.: *Komórki macierzyste organizmu dorosłego w biologii i medycynie*. Post. Biol. Kom. 2009, 36 (supl. 25), 99–110.

Kloc M., Biliński S. M.: *Lokalizacja morfogenów w oocytach kręgowców*. Post. Biol. Kom. 2000, 27, Supl. 15, 121–132.

Korta K. i wsp.: *Komórki macierzyste i progenitorowe w biostrukturze ścian naczyń krwionośnych*. Post. Hig. Med. Dośw. 2013, 67, 982–995.

Krzanowska H.: *Geny a różnicowanie się i rozwój*. W: *Genetyka molekularna*, red. P. Węgleński. Wyd. VI, zmienione. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2012, 280–321.

Kubiak J.Z., Ciemerych M.A.: *Od Gurdona do Yamanaki, czyli krótka historia reprogramowania komórek*. Post. Bioch. 2013, 59, 124–130.

Ogielska M.: *Informacja matczyna w oocytach płazów*. Post. Biol. Kom. 1999, 26, Supl. 12, 69–72.

Riddle R.D., Tabin C. J.: *Od zawiązka do kończyny*. Świat Nauki 1999, 4 (92), 59–63.

Skalska U., Kontny E.: *Właściwości regeneracyjne i immunomodulacyjne mezenchymalnych komórek macierzystych z tkanki tłuszczowej*. Post. Biol. Kom. 38, 2011, 363-378.

Witkowska A., Ciemerych M. A., Suwińska A.: *Ludzkie zarodkowe komórki macierzyste – regulacja pluripotencji i różnicowania*. Post. Biol. Kom. 2010, 37, 23-40.

ROZDZIAŁ 6

Błony biologiczne i transport przez błony

Jerzy Kawiak, Tadeusz Pacuszka

HASŁA

Błona komórkowa

Oddziela środowisko wewnętrzne komórki od otoczenia i reguluje oddziaływania ze środowiskiem i innymi komórkami. U eukariota wnętrze komórki jest dodatkowo podzielone błonami śródkomórkowymi na mniejsze przedziały umożliwiające jednoczesne prowadzenie reakcji biosyntezy (retikulum endoplazmatyczne, aparat Golgiego) i hydrolizy (endosomy, lizosomy), a także na gromadzenie tam jonów i określonych substancji.

Dwuwarstwa lipidowa

Dwuwarstwa lipidowa zbudowana jest z glicerofosfolipidów, zwanych także fosfatydami, sfingolipidów i steroli. Glicerofosfolipidy i fosfosfingolipidy noszą wspólną nazwę fosfolipidów. Fosfolipidy i sterole są podstawowymi cząsteczkami błon biologicznych. Tworzą półpłynną, asymetrycznie zbudowaną dwuwarstwę lipidową, w której wyróżnia się warstwę lipidów E (od strony środowiska) oraz warstwę lipidów P (od strony cytoplazmy). Glicerofosfolipidy są syntetyzowane w warstwie P retikulum endoplazmatycznego, a także w aparacie Golgiego. W retikulum endoplazmatycznym syntetyzowane są także sterole i tu ma początek biosynteza sfingolipidów, kontynuowana w aparacie Golgiego.

Nowo zsyntetyzowane lipidy błonowe przemieszczane są wewnątrz komórki jako: (1) pęcherzyki błonowe w procesie uwalniania z błony donorowej i fuzji z błoną akceptorową, (2) w procesie egzocytozy jako pojedyncze cząsteczki z udziałem białkowych przenośników lipidów, a także (3) poprzez kontakt i wymianę lipidów między błonami, również z udziałem przenośników. Cholesterol jest głównym sterolem błon komórek zwierzęcych, a jedynym w błonach komórek ssaków. Reguluje płynność błony i jest składnikiem mikrodomen błonowych, takich jak kaweole i tratwy lipidowe.

Białka błonowe

Transport wielu substancji przez dwuwarstwę lipidową może odbywać się dzięki wbudowanym w nią białkom. Wyróżnia się białka integralne przenikające przez dwuwarstwę domeną zbudowaną z około 20 aminokwasów, przyjmującą strukturę α-helisy, oraz białka związane z powierzchnią błony – białka powierzchniowe. Białka integralne są wbudowywane do błony w procesie kotranslacji albo przez fałdowanie łańcucha polipeptydowego. Specjalną formą wiązania z warstwą E błony charakteryzują się białka GPI zakotwiczone w błonie poprzez resztę związanego kowalencyjnie z białkiem glikozylofosfatydyloinozytolu, a także występujące w warstwie P białka acylowane kwasami tłuszczowymi oraz białka prenylowane.

Białka błony komórkowej erytrocytu

Są to glikoforyna i białko 3 szczytu elektroforetycznego. Te są powiązane z białkami powierzchniowy-

mi i białkami szkieletu błony, co nadaje całej strukturze stabilność i dobre właściwości mechaniczne.

Glikokaliks

Jest zbudowany z łańcuchów cukrowcowych glikolipidów i glikoprotein błonowych na powierzchni komórki. Bierze udział w oddziaływaniach między komórkami oraz substancją międzykomórkową.

Transport prosty

Nie wymaga przenośników, gdyż małe, chociaż polarne cząsteczki, jak np. woda czy mocznik, a także gazy (CO_2, NO) dość łatwo dyfundują.

Transport ułatwiony

Odbywa się przez błony biologiczne z udziałem białek przenośnikowych i białek tworzących kanały. W błonie komórkowej są białka swoiście przenoszące aminokwasy, cukry, nukleozydy zgodnie z gradientem ich stężenia. Efektywność przenoszenia zależy też od liczby transporterów, co może być regulowane przez komórkę, np. transportery glukozy GLUT4 w adipocytach i komórkach mięśniowych przemieszczają się na powierzchnię komórki pod wpływem insuliny. Białka tworzące kanały to otwarte pory w dwuwarstwie lipidowej, przez które przenikają cząstki odpowiedniej wielkości i ładunku. Przenikanie przez niektóre kanały może być regulowane, gdyż mogą one przybierać konfigurację otwartą lub zamkniętą.

Transport aktywny

Przykładem jest pompa sodowa przenosząca jony Na^+ na zewnątrz komórki i jony K^+ do komórki. Pompa zużywa energię ATP. Gradient jonów Na^+ powstały w wyniku działania pompy jest często dodatkowo wykorzystywany do wtórnego, sprzężonego aktywnego transportu wielu substancji.

Endocytoza i kaweole

Pobieranie substancji do komórki w formie otoczonych błoną pęcherzyków. Istnieją różne mechanizmy endocytozy: fagocytoza, pinocytoza, transport tranzytowy. W wielu komórkach obserwuje się liczne, regularne wgłębienia błony komórkowej o średnicy 50–100 nm, które nazwano kaweolami. Kaweole są morfologicznie uporządkowanymi domenami błony komórkowej i stanowią jedną z form tratw lipidowych. Tratwy lipidowe zawierają dużo cholesterolu i sfingolipidów oraz białka receptorowe wielu komórkowych układów sygnalizacji. Składnikami struktury kaweoli są charakterystyczne białka nazywane kaweolinami.

Oporność wielolekowa (nie mylić z odpornością)

Spowodowana jest nadmierną aktywnością układu transportującego z komórek substancje toksyczne. Jest to transport aktywny, zużywający ATP. Taka oporność jest przyczyną niepowodzeń w leczeniu schorzeń bakteryjnych i nowotworowych.

Fuzja błon

Powszechnie występujący proces w komórkach, np. podczas endocytozy, wydzielania. W embriogenezie fuzja komórek mięśniowych zachodzi podczas miogenezy. Sztucznie wywołana fuzja komórki nowotworowej (szpiczaka) daje hybrydę, nazywaną hybrydomą, limfocytu B i wytwarzającą immunoglobulinę monoklonalną. Immunoglobuliny monoklonalne są wykorzystywane m. in. w diagnostyce i leczeniu chorych.

Błona komórkowa – oddzielenie środowiska wewnętrznego komórki od otoczenia

Podstawową strukturą komórki jest błona komórkowa, która oddziela środowisko wewnętrzne komórki od otoczenia. W tym wewnętrznym środowisku zachodzą przemiany obniżające entropię, prowadzące do wytwarzania energii układu i gromadzenia jej, czyli działające miejscowo, przeciwnie niż w całym otoczeniu komórki. Jest to jedna z najważniejszych cech życia. Wirusy nie są komórkami, bo nie mają układów zdolnych do odtwarzania składników błony komórkowej. Mogą jedynie skorzystać z fragmentu błony komórki gospodarza i włączyć do niej własne białka. Ich genom do namnażania się musi korzystać z gościny w komórkach (ryc. 6.1).

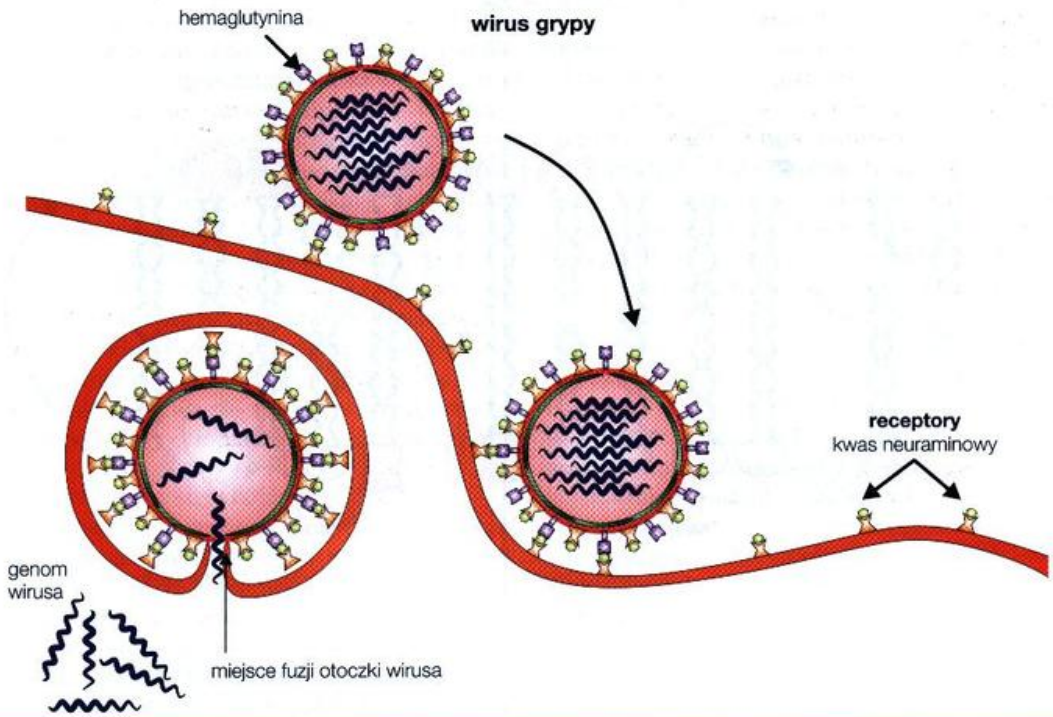
Środowisko wewnątrz komórki podzielone błonami (u eukariota)

Organizmy żywe dzieli się na prokariota i eukariota. W przeciwieństwie do komórek prokariota, komórki eukariota, oprócz błony komórkowej, mają podzielone błonami śródplazmatycznymi środowisko wewnętrzne na mniejsze przedziały wewnątrzkomórkowe. Tak oddzielony jest również genom, tworzący jądro komórki. W tabeli 6.1 można porównać wielkość genomu w organizmach pro- i eukariotycznych. Znacznie rozbudowana powierzchnia błon wewnątrz komórki umożliwia:

a) wykorzystanie wewnątrz komórki procesów transportu do wytwarzania i gromadzenia energii, a nie tylko na granicy ze światem zewnętrznym jak u prokariota,

b) tworzenie w pewnych okolicach komórki magazynów jonów i innych substancji,

c) transport cząsteczek w określonych kierunkach wewnątrz komórki.



Rycina 6.1 Wnikanie wirusa grypy do komórki. Wirus grypy wiąże się glikoproteiną otoczki, hemaglutyniną, z receptorami na powierzchni komórki. Receptory mają kwas neuraminowy wiązany przez hemaglutyninę. Genom grypy (8 nici RNA) wewnątrz komórki jest uwalniany do cytoplazmy, gdzie replikuje się oraz odtwarza białka wirusa (wg A. S Monto).

Tabela 6.1 Liczba par zasad genomu oraz zawartość DNA organizmów prokariota i eukariota

Organizm	Wielkość genomu		Liczba chromosomów[1]
	liczba par zasad $\times 10^7$	zawartość DNA pg/komórkę	
E. coli	0,4	0,017[2]	1
Saccharomyces cerv.	1,35	0,028[3]	12–18[4]
Drosophila melanog.	16,5	0,35[3]	4
Homo sapiens	290	6,1[3]	23

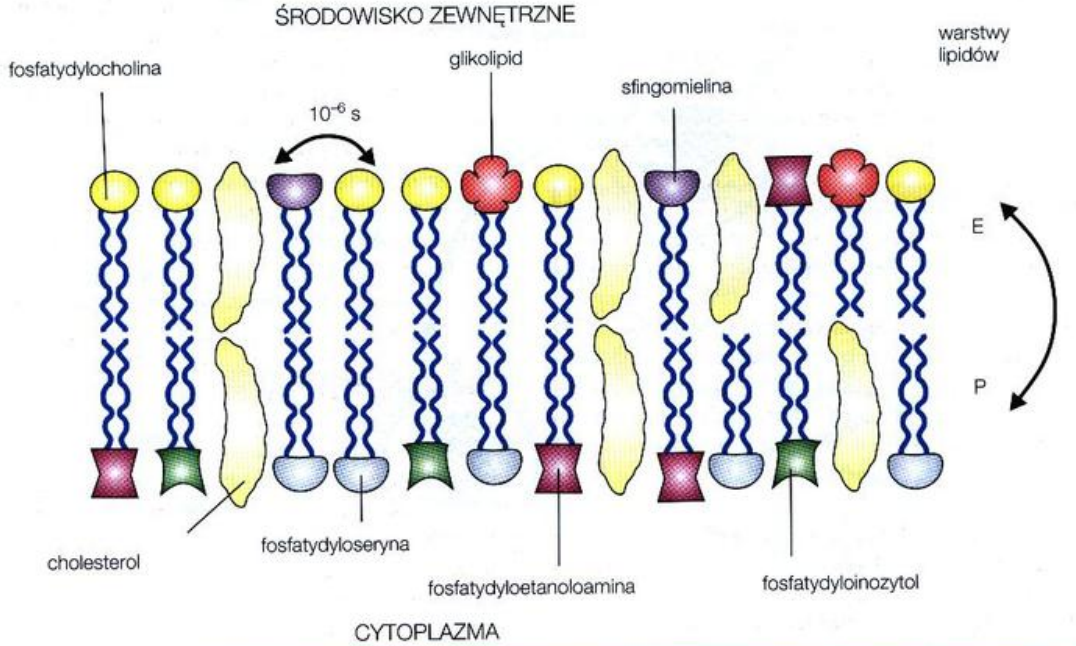
[1] Liczba haploidalna.
[2] Szybko rosnące *E. coli* mają średnio 4 genomy DNA, każdy ok. 0,0044 pg.
[3] Genom diploidalny.
[4] Różne odmiany drożdży.

Dwuwarstwa fosfolipidowa – podstawowa struktura błon biologicznych

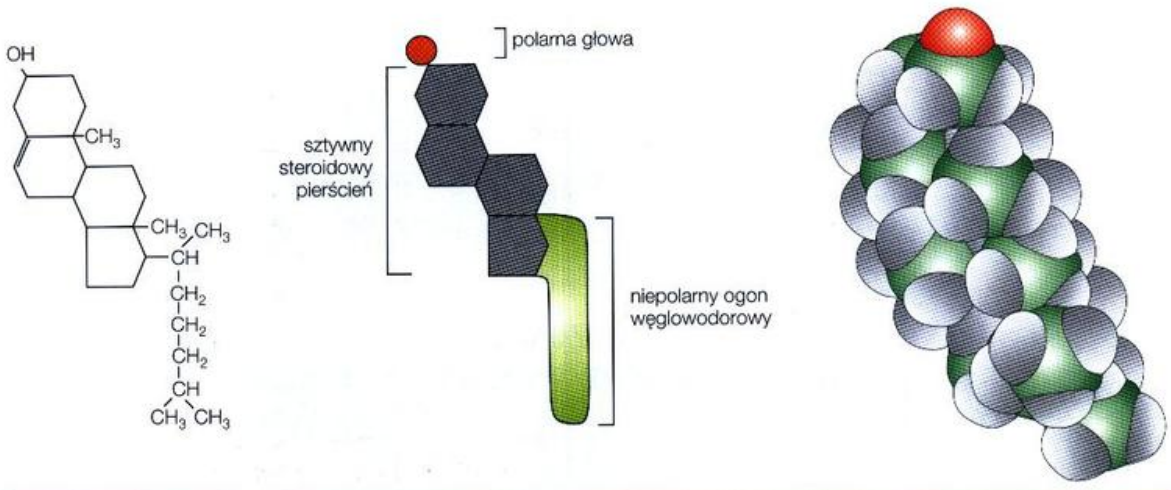
Błony komórkowe zbudowane są z lipidów i białek. W błonach komórkowych na jedną cząsteczkę białka przypada kilkadziesiąt cząsteczek lipidów. Lipidy błon komórkowych to oparte na rdzeniu glicerolu glicerofosfolipidy, zawierające w swej budowie sfingozynę, sfingolipidy (dzielące się na fosfosfingolipidy i glikosfingolipidy) i sterole (ryc. 6.2–6.4). Podstawowym sterolem zwierzęcych błon komórkowych jest cholesterol (ryc. 6.3).

Dwuwarstwa lipidowa

Lipidy błonowe są cząsteczkami amfipatycznymi, bo w ich budowie wyróżnia się hydrofobową część ogonową (łańcuchy węglowodorowe kwasów tłusz-



Rycina 6.2 Lipidowe składniki błony komórkowej układają się w dwuwarstwę. Warstwa od środowiska zewnętrznego (E) składa się z fosfatydylocholiny, sfingomieliny i glikolipidów, a w skład warstwy cytoplazmatycznej (P) wchodzą fosfatydyloseryna, fosfatydyloinozytol i fosfatydyloetanololamina. Cholesterol jest w obu warstwach. Wymiana sąsiadujących ze sobą cząsteczek fosfolipidu, czyli dyfuzja boczna w obrębie tej samej warstwy, zachodzi co około 10^{-6} s. Wymiana lipidów między warstwami, tzw. ruchy flip-flop, przebiega dużo wolniej i zależy od wielkości fragmentu hydrofilnego cząsteczek. Waha się ona od poniżej 1 ms w przypadku cholesterolu poprzez wiele godzin w przypadku fosfolipidów, a dni w przypadku glikosfingolipidów.

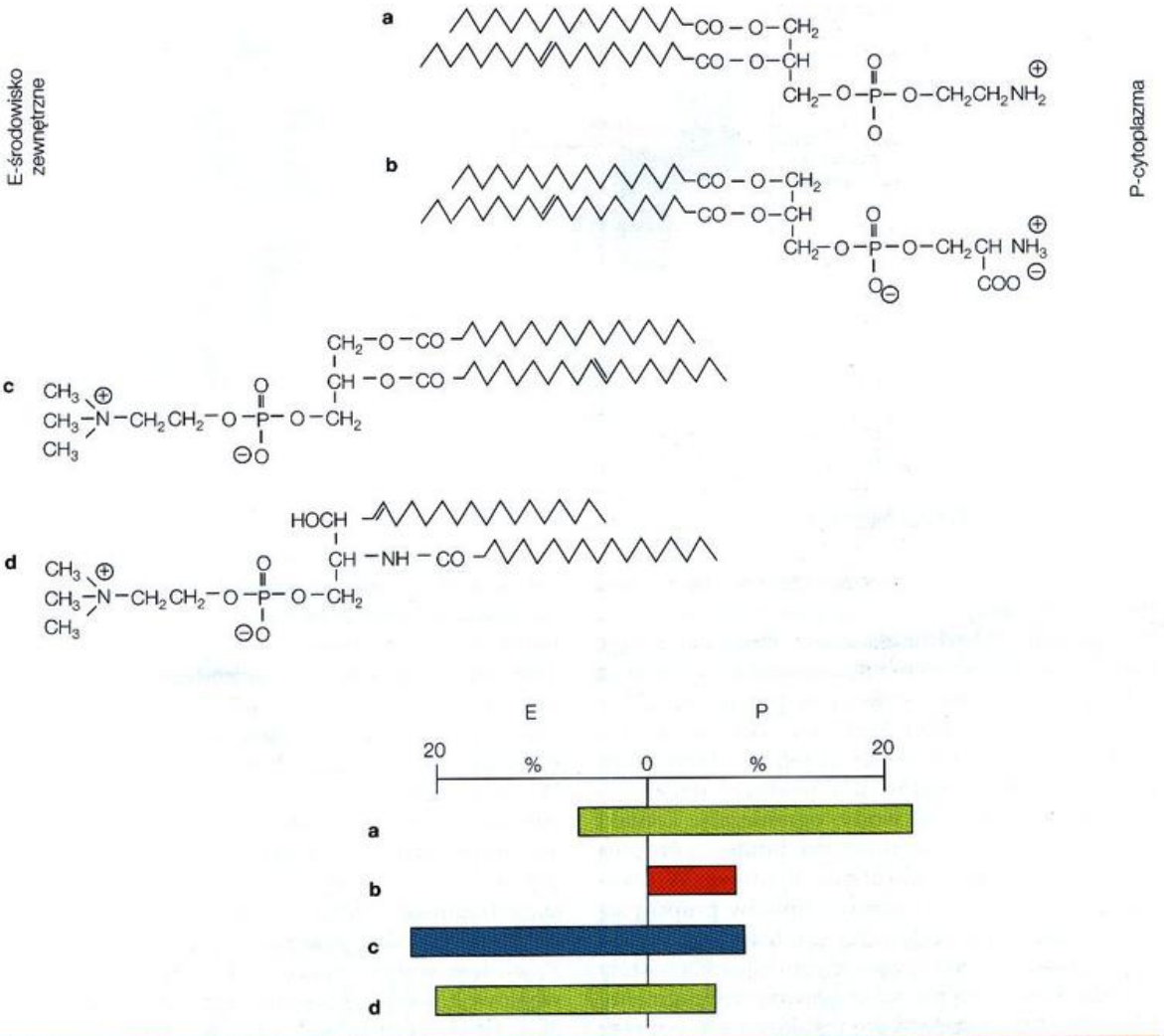


Rycina 6.3 Wzór strukturalny cholesterolu.

czowych glicerofosfolipidów, sfingozyna i kwas tłuszczowy sfingolipidów, prawie cała cząsteczka cholesterolu) i hydrofilną część głowową. Część hydrofilna cholesterolu jest niewielka: stanowi ją jedynie grupa –OH, natomiast w przypadku glikosfingolipidów to nawet 20–30 reszt cukrowcowych. Amfipatyczne właściwości lipidów błonowych powodują, że w środowisku wodnym (efekt hydrofobowy) cząsteczki wody, ograniczając kontakt z hydrofobowymi fragmentami lipidów, grupują je razem, tworząc dwuwarstwę lipidową. W dwuwarstwie hydrofilne fragmenty lipidów grupują się na zewnątrz, do środowiska wodnego, natomiast hydrofobowe reszty ogonowe, unikając kontaktów z wodą, kierują się razem do wewnątrz. Fragmenty hydrofobowe są dodatkowo stabilizowane poprzez wiązania wodorowe i oddziaływania sił van der Waalsa. To woda „tworzy" dwuwarstwę, posługując się w tym celu odpowiednio zbudowanymi lipidami. W błonach komórkowych warstwę lipidów od strony środowiska nazywa się warstwą E (*exoplasmic*), a warstwę od strony cytoplazmy P (*protoplasmic*).

Płynność dwuwarstwy lipidowej

Płynność błon biologicznych polega na tym, że wchodzące w ich skład lipidy i białka mogą się poruszać. W ramach tej samej cząsteczki lipidów występuje ruch wokół wiązania $-H_2C-CH_2-$, którego swoboda warunkuje pozostałe ruchy cząsteczek. Jako całość cząsteczki lipidów wykazują **ruchy rotacyjne** (dyfuzja rotacyjna), **ruchy lateralne**, tj. na boki (dyfuzja lateralna), i **ruchy międzywarstwowe** o nazwie „flip-flop" polegające na przemieszczeniu cząsteczek z jednej warstwy błony do drugiej (ryc. 6.2). Szybkość tego zjawiska zależy w znacznym stopniu od wielkości hydrofilnej reszty głowowej lipidów i waha się od μsek i msek w przypadku cholesterolu, diacyloglicerolu i ceramidu, godzin w przypadku fosfolipidów, aż do wielu dni w przypadku glikosfingolipidów. Płynność błon zależy od temperatury i budowy wchodzących w nie lipidów (ryc. 6.5). W odpowiednio wysokiej temperaturze lipidy błonowe wykonują wszystkie wymienione ruchy, a błona jest w stanie ciekłym nieuporządkowanym *ld (liquid disordered)*. Obniżenie temperatury powoduje, że fragmenty cząsteczek lipidów nie będą miały dość energii, aby pokonać utrudnienia związane z obrotem wokół wiązania $-H_2C-CH_2-$. Łańcuchy węglowodorowe glicerofosfolipidów i sfingolipidów będą nieruchome, maksymalnie rozciągnięte i ściśle upakowane. Zanikną wszystkie pozostałe formy ruchu, a błona będzie w stanie stałym uporządkowanym *so (solid ordered)*. Błona w stanie *ld* jest około 1000 razy bardziej płynna niż w stanie *so*. Łańcuchy kwasów tłuszczowych w fosfolipidach błonowych mają zwykle 14–24 atomów węgla. Długołańcuchowe, nasycone reszty kwasów tłuszczowych zmniejszają płynność błony. Odwrotny efekt powodują reszty krótsze, a zwłaszcza zawierające wiązania podwójne. Cholesterol zmniejsza płynność błony, ale jednocześnie utrudnia ścisłe upakowanie długołańcuchowych nasyconych reszt kwasów tłuszczowych, formując w błonie fragmenty (domeny) w stanie płynnym uporządkowanym *lo (liquid ordered)*. Domeny te, bogate w sfingolipidy o długołańcuchowych nasyconych kwasach tłuszczowych i cholesterol, charakteryzują się kilkakrotnie mniejszą płynnością niż pozostała błona i jak tratwy „pły-



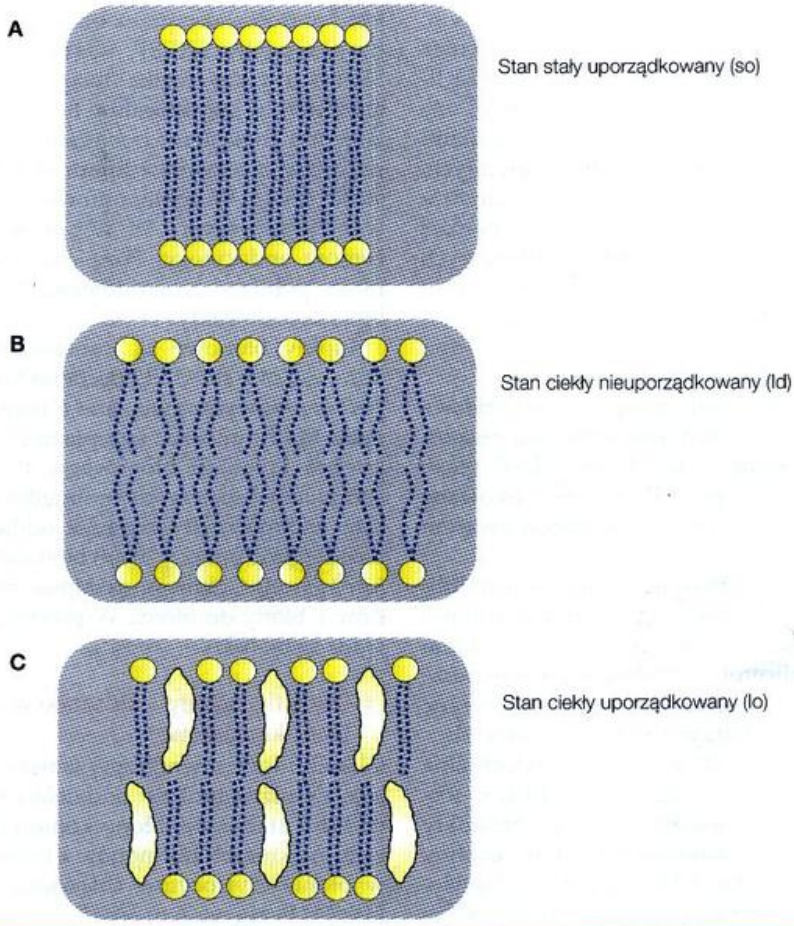
Rycina 6.4 Wzory i ułożenie w dwuwarstwie fosfolipidów aminowych: fosfatydyloetanolaminy (**a**) i fosfatydyloseryny (**b**) warstwy cytoplazmatycznej (P) błony oraz wzory fosfolipidów cholinowych: fosfatydylocholiny (**c**) i sfingomieliny (**d**) warstwy powierzchniowej (E) błony erytrocytu człowieka. U dołu przedstawiono (wg Verkleij i wsp. 1973) odsetkowy udział tych fosfolipidów w warstwach P i E.

wają" wśród bardziej płynnych lipidów w stanie *ld*. Białka błony wykazują ruchy rotacyjne i lateralne. Na szybkość i charakter ruchów białek i lipidów ma wpływ cytoszkielet komórkowy. Cytoszkielet ogranicza i modyfikuje ruch lipidów i białek oraz sprzyja powstawaniu domen błonowych.

Asymetria błon komórkowych – warstwy lipidów E i P

Błony komórkowe charakteryzują się dwoma rodzajami nierównomiernego występowania lipidów i białek. Asymetria międzywarstwowa to niejednakowy skład lipidów w warstwach E i P. Zjawisko to ma dwie przyczyny. Pierwsza to aktywność białek: flopazy i flipazy.

Flopazy (białka P, oporności wielolekowej) transportują lipidy z warstwy P do warstwy E. Transport ten jest mało swoisty i wymaga energii. **Flipaza** aminofosfolipidów albo translokaza aminofosfolipidów transportuje specyficznie fosfatydyloetanoloaminę i fosfatydyloserynę z warstwy E do warstwy P, a do swojej aktywności także wymaga energii. Stąd warstwa P erytrocytów zawiera większość fosfatydyloetanoloaminy i prawie całą fosfatydyloserynę błony. **Skramblaza** jest białkiem przenoszącym, mieszającym lipidy obu warstw. Nie wymaga energii,



Rycina 6.5 Występowanie lipidów w błonach. **A.** Stan stały uporządkowany: występuje w niskiej temperaturze, brak możliwości obrotu wokół wiązania $-CH_2-CH_2-$ maksymalnie rozciągnięte łańcuchy kwasów tłuszczowych cząsteczek fosfolipidów, ścisłe upakowanie cząsteczek, znaczne ograniczenie wszystkich form ruchu. **B.** Stan ciekły nieuporządkowany: występuje w wysokiej temperaturze, swoboda obrotu wokół wiązania $-CH_2-CH_2-$, luźne upakowanie cząsteczek i swoboda ich ruchu. **C.** Stan ciekły uporządkowany: rozciągnięte łańcuchy kwasów tłuszczowych, znacznie ograniczona swoboda obrotu wokół wiązania $-CH_2-CH_2-$, ale występowanie cholesterolu przeciwdziała ścisłemu upakowaniu cząsteczek, stąd tylko nieznaczne ograniczenie ruchów rotacyjnych i lateralnych.

jest aktywowana wzrostem wewnątrzkomórkowego stężenia Ca^{2+}, a także w procesie apoptozy.

Druga przyczyna asymetrii międzywarstwowej, szczególnie widoczna w przypadku większości glikosfingolipidów, wynika z lokalizacji ich biosyntezy wewnątrz aparatu Golgiego. Hydrofilne reszty cukrowcowe glikosfingolipidów znacznie utrudniają przemieszczenie tych związków na stronę P. Pęcherzyki egzocytotyczne odrywające się od aparatu Golgiego ulegają fuzji z błoną komórkową, a ich wewnętrzna strona staje się zewnętrzną warstwą błony.

Asymetria lateralna to występowanie rozmaitych i różnorodnych domen błonowych.

Domeny błonowe

Domeną błonową nazywa się fragment różniący się swoimi właściwościami od reszty błony. Domeny błonowe nie stanowią zaprzeczenia modelu błony komórkowej jako płynnej mozaiki lipidów i białek, ale jej uzupełnienie. Ograniczenia swobody ruchu lipidów i białek to czynniki domenotwórcze. Do czynników domenotwórczych błon biologicznych zalicza się m. in. połączenia zamykające między komórkami nabłonka, dzielące błonę na warstwę apikalną i bazolateralną (domeny duże, mające kilka μm, trwałe przez całe życie komórki).

Domenotwórcze są też miejsca adhezji między komórką a macierzą międzykomórkową oraz miej-

sca oddziaływania z cytoszkieletem komórkowym. Do powstawania domen przyczyniają się również oddziaływania pomiędzy swoistymi białkami i lipidami (kaweolina, kawina), dające kaweole, czy uprzywilejowane oddziaływania między lipidami błony, prowadzące do powstawania rozmaitych, dynamicznych form tratw lipidowych (nanotratwy, wielkość poniżej 10 nm, czas trwania poniżej 0,1 ms). Ważną funkcją mikrodomen błonowych jest ich udział w przekazywaniu sygnałów, o czym będzie mowa w podrozdz. *Endocytoza i kaweole*.

Biosynteza lipidów błonowych

Glicerofosfolipidy i fosfosfingolipidy noszą nazwę fosfolipidów (ryc. 6.4). Wspólną strukturą glicerofosfolipdów jest kwas fosfatydowy: rdzeń glicerolu, którego dwie grupy –OH są zestryfikowane resztami kwasów tłuszczowych, a trzecia kwasem ortofosforowym.

Podstawowa droga biosyntezy glicerofosfolipidów zaczyna się od reakcji cytydynotrifosforanu (CTP) z kwasem fosfatydowym, której produktem jest CDP-diacyloglicerol. CDP-diacyloglicerol może reagować z seryną i utworzyć fosfatydyloserynę lub z inozytolem i utworzyć fosfatydyloinozytol.

Fosfotydyloetanoloamina i fosfatydylocholina mogą powstawać w wyniku modyfikacji fosfatydyloseryny lub niezależnie jako produkty przeniesienia reszt etanoloaminy lub choliny z CDP-etanoloaminy lub CDP-choliny na diacyloglicerol. Miejscem biosyntezy glicerofosfolipidów jest warstwa P retikulum endoplazmatycznego. Lipidy z szybko rosnącej warstwy P przenoszone są do warstwy E przez nieswoiste flipazy. Biosynteza sfingolipidów zaczyna się także w warstwie P retikulum endoplazmatycznego syntezą ceramidu, czyli acylowanej kwasem tłuszczowym sfingozyny. Ceramid transportowany jest do aparatu Golgiego jako składnik pęcherzyków błonowych, a także przez transportujące ceramid białko CERT. Ceramid w warstwie P aparatu Golgiego może ulec glikozylacji, wchodząc we wspomniany szlak biosyntezy glikosfingolipidów, albo przedostać się na zasadzie flip-flop do warstwy E. W warstwie E ceramid staje się substratem syntaz sfingomieliny. Syntazy sfingomieliny przenoszą resztę fosfocholiny z fosfatydylocholiny na ceramid i tworzą diacyloglicerol i sfingomielinę.

Komórki dysponują dwoma źródłami cholesterolu (ryc. 6.3). Synteza „własnego" cholesterolu rozpoczyna się od kondensacji dwóch cząsteczek acetylo-CoA. W syntezę cholesteroli zaangażowanych jest dwanaście białek enzymatycznych. Proces jest kontrolowany przez białka, takie jak: czynniki transkrypcyjne SREBP, wiążące się z nimi białka SCAP, a także białka Insigs. Miejscem syntezy cholesterolu jest retikulum endoplazmatyczne. Egzogenny cholesterol pobierany jest ze środowiska w formie związanej z lipoproteinami o niskiej gęstości (LDL). W pobieraniu cholesterolu zaangażowany jest receptor LDL w procesie zależnej od receptora endocytozy. Poza cholesterolem komórki mogą pobierać ze środowiska także sfingolipidy i glicerofosfolipidy.

Lipidy błonowe są transportowane wewnątrz komórki jako składniki pęcherzyków w transporcie pęcherzykowym, związane z białkami przenoszącymi lipidy poprzez cytoplazmę, a także poprzez miejsca kontaktu błonowego. W miejscach tych, spotykanych najczęściej pomiędzy błonami retikulum endoplazmatycznego a oddalonymi od nich na odległość poniżej 30 nm błonami mitochondriów lub aparatu Golgiego, następuje przeniesienie lipidów z błony do błony. W procesie tym zaangażowane są białka.

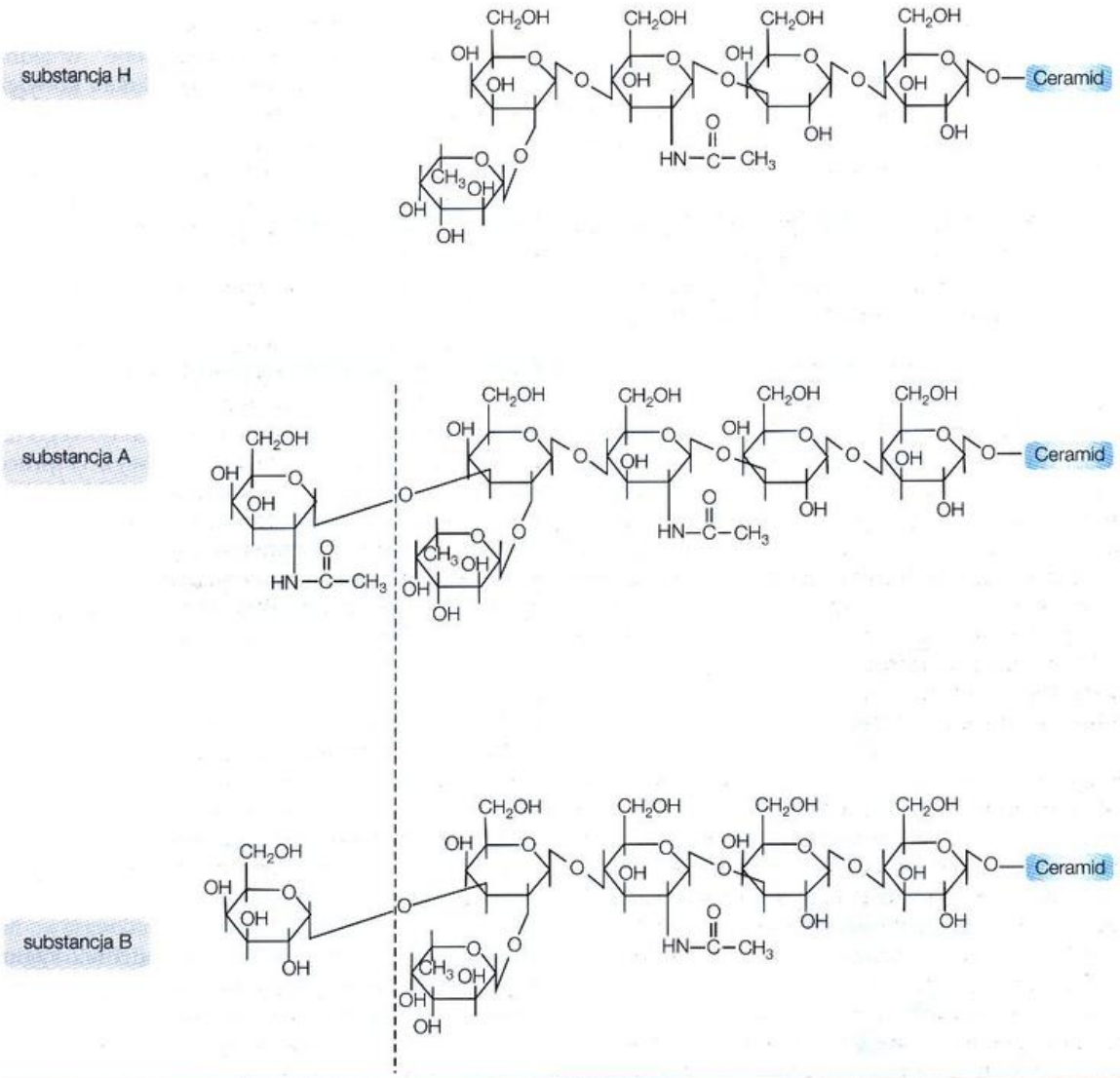
Glikosfingolipidy – składniki warstwy E błony komórkowej

Glikolipidom zewnętrznej warstwy błony przypisuje się różne funkcje: oddzielają komórkę od otoczenia i stabilizują błonę komórkową, są receptorami niektórych hormonów i toksyn bakteryjnych, w błonie erytrocytów człowieka określają grupy krwi A, B, H (ryc. 6.6).

KLINIKA

Antygeny A, B, H są obecne na powierzchni erytrocytów i innych komórek organizmu, z wyjątkiem neuronów. W osoczu krwi stale są obecne krążące naturalne przeciwciała przeciwko antygenom A, B i H nieobecnym na własnych krwinkach. Dlatego w przypadku przetaczania krwi tak istotny jest dobór krwinek właśnie w tym układzie grupowym.

Dotychczas nie udało się wyjaśnić, z jakimi funkcjami błony komórkowej wiąże się niezwykła rozmaitość budowy glikosfingolipdów. Rozmaitość tę ilustruje około 200 różnych łańcuchów cukrowcowych, które dodatkowo mogą występować w połączeniu z różniącymi się budową ceramidami. Biosynteza większości glikosfingolipidów zaczyna się od przeniesienia cząsteczki glukozy na ceramid po stronie P aparatu Golgiego. Powstający glukozyloceramid jest przemieszczany następnie do retikulum endoplazmatycznego i z powrotem, ale tym



Rycina 6.6 Najprostsze glikosfingolipidy o aktywności grupowej ABO (H) człowieka. Łańcuchy cukrowcowe są związane z resztami ceramidu (CER) „zanurzonymi" w warstwie E błony komórkowej. Linia przerywana oddziela powtarzaną część łańcucha cukrowcowego.

razem do warstwy E aparatu Golgiego. Znajdują się tam **glikozylotransferazy,** które wydłużają łańcuch cukrowcowy glukozyloceramidu, przekształcając go w bardziej złożone glikosfingolipidy. Glikosfingolipidy wraz z innym elementami błony wędrują w formie pęcherzyków transportujących do błony plazmatycznej, z którą pęcherzyki się zlewają. Dodatkowym źródłem glikosfingolipidów komórki jest otaczające ją środowisko. Zwykle tą drogą komórki pobierają bardzo małe ilości glikosfingolipidów, z wyjątkiem niektórych komórek nowotworowych, np. czerniaka.

Podstawowe funkcje dwuwarstwy lipidowej

Zawieszając w wodzie wysuszony preparat fosfatydylocholiny, otrzymuje się sztuczną dwuwarstwę fosfolipidową, która może przyjąć formę pęcherzyka, tzw. liposomu, naśladującego komórkę. Błona taka będzie odkształcalna, elastyczna, przepuszczalna dla małych cząsteczek, takich jak woda, CO_2, a nieprzepuszczalna dla jonów i dużych cząsteczek, jak nukleotydy czy peptydy. W zależności od temperatury jednoskładnikowa błona będzie występowała w stanie ciekłym nieuporządkowanym *ld* lub stałym uporządkowanym *so* (ryc. 6.5). Zawieszając

w wodzie fosfatydylocholinę, sfingomielinę o nasyconym kwasie tłuszczowym i cholesterol, otrzymuje się błonę, w której fragmenty (domeny) w stanie *ld* będą występowały razem z fragmentami w stanie ciekłym uporządkowanym *lo*. Wprawdzie większość lipidów błon komórkowych należy do trzech klas związków, ale w ich ramach występują setki cząsteczek różniących się budową części głowowej, a także długością i liczbą wiązań podwójnych wchodzących w ich skład reszt kwasów tłuszczowych. Lipidy te zapewniają dynamiczne środowisko tworzące domeny, w którym funkcjonują białka błonowe.

Błona komórkowa i błony śródkomórkowe powinny zapewniać możliwość efektywnego i wybiórczego transportu wielu substancji, które w wyniku dyfuzji prostej nie przenikają przez dwuwarstwę lipidową z szybkością konieczną do życia komórki. Wbudowane do błon białka pełnią m.in. funkcje transportowe. Aby bliżej poznać te funkcje, trzeba zastanowić się, jak białka są rozmieszczone w dwuwarstwie lipidowej.

Białka błonowe

Białka błony komórkowej są niezbędne m.in. do tego, aby komórki mogły pobierać substancje odżywcze i usuwać zbędne metabolity oraz utrzymywać odpowiednie wewnątrzkomórkowe środowisko jonowe. Podobnie białka błonowe struktur śródplazmatycznych wpływają na transport substancji między tymi oddzielonymi regionami.

Białka są związane z dwuwarstwą lipidową w różny sposób. Na tej podstawie dzieli się białka błonowe na integralne i powierzchniowe (peryferyczne). Białka integralne błon biologicznych zwykle nie działają pojedynczo, ale najczęściej tworzą kompleksy o określonych funkcjach z białkami powierzchniowymi. Białka powierzchniowe stale pozostają związane z jedną z powierzchni dwuwarstwy lipidowej.

Integralne białka błonowe

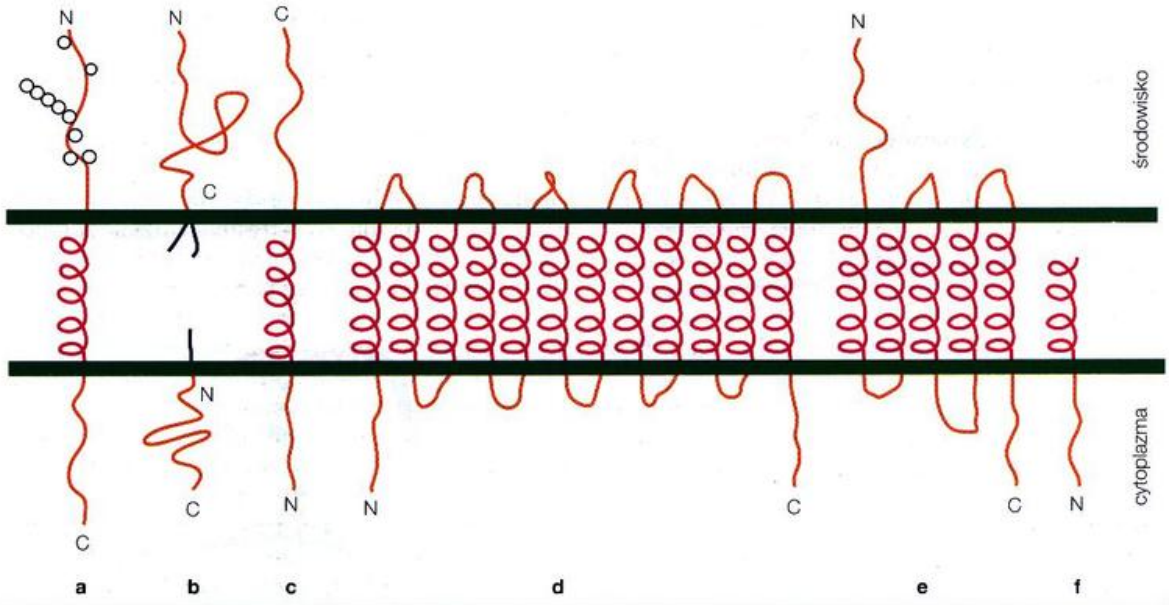
Białka integralne przenikają (przebijają) błonę, występując po obu jej stronach. Niektóre białka integralne przebijają wielokrotnie dwuwarstwę. Białka integralne wiążą się bezpośrednio z hydrofobowym wnętrzem dwuwarstwy fosfolipidowej (ryc. 6.7 i 6.8). Nie można ich wyizolować z błony bez naruszenia jej struktury, czego zwykle dokonuje się, stosując detergenty lub rozpuszczalniki organiczne. Białka integralne dzieli się na białka politopowe (transbłonowe), przechodzące przez błonę, białka monotopowe „zanurzone" w jednej z warstw dwuwarstwy lipidowej i białka z kotwiczką lipidową.

Białka powierzchniowe błon

Białka powierzchniowe związane są z błoną poprzez wiązania jonowe (często z udziałem jonów Ca^{2+}), wiązania wodorowe i oddziaływania hydrofobowe, a także poprzez fragmenty lipidowe wchodzące w skład błony. Do tych ostatnich należą białka związane z błoną poprzez resztę glikozylofatydyloinozytolu (warstwa E dwuwarstwy) i białka z przyłączoną resztą kwasu palmitynowego, mirystynowego, fragmentu izoprenowego lub cholesterolu (warstwa P dwuwarstwy). W procesach przekazywania sygnału poprzez błony lipidy warstwy P mogą tworzyć fragmenty wiążące określone białka cytoplazmatyczne, które stają się przejściowo białkami powierzchniowymi błony. Białka powierzchniowe można uwolnić z błon z użyciem środków chelatujących lub wysokiego stężenia soli.

Wbudowywanie białek do błon w procesie kotranslacji

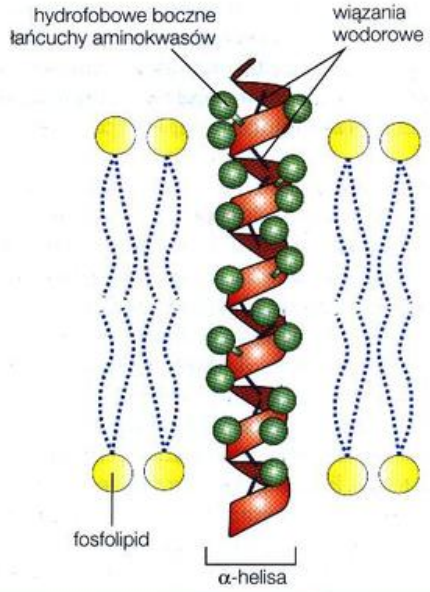
Większość białek integralnych błon biologicznych jest syntetyzowana na rybosomach związanych z błonami siateczki śródplazmatycznej ziarnistej (ryc. 6.9a). Początkowy odcinek N-końca łańcucha polipeptydowego, syntetyzowany na rybosomie, zbudowany z około 20 reszt aminokwasów, ma charakter hydrofobowy. Ten tzw. **odcinek sygnałowy** po związaniu znajdującej się w cytoplazmie małej cząsteczki nukleoproteiny SRP (ang. *signal recognition particle*) może wnikać do dwuwarstwy lipidowej błony, gdzie zostaje otoczony przez receptory tworzące kanał w dwuwarstwie, przez który mogą przesuwać się dalsze odcinki łańcucha polipeptydowego, w tym również hydrofilne domeny łańcucha. W ten sposób biosynteza łańcucha polipeptydowego, czyli **translacja**, zachodzi jednocześnie **z translokacją**, czyli przesuwaniem go przez kanał w dwuwarstwie lipidowej. Proces ten dlatego nazywa się **kotranslacją**. Odcinek sygnałowy zostaje potem odcięty przez proteazę i dalej biegnie biosynteza oraz przesuwanie kanałem błonowym domen hydrofilnych. Kotranslacja kończy się syntezą drugiej domeny hydrofobowej polipeptydu, tym razem służącej do zakotwiczenia łańcucha w błonie. W łańcuchu polipeptydu takich hydrofobowych domen może być kilka.



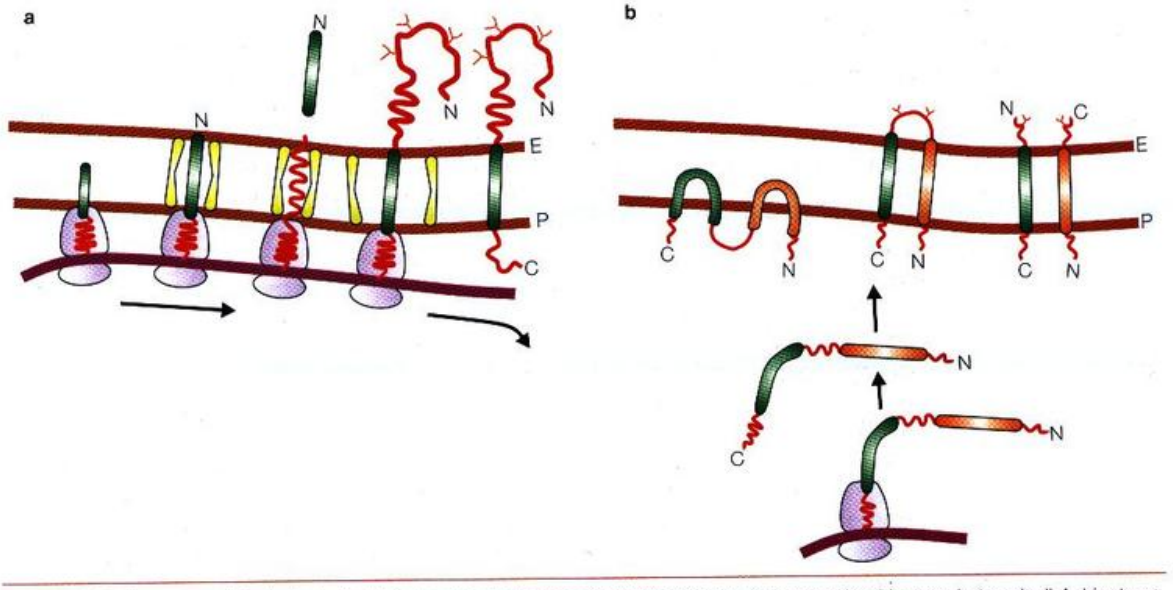
Rycina 6.7 Przykłady zakotwiczenia białek integralnych w dwuwarstwie lipidowej błony. Białka mogą być zakotwiczone jedną α-helisą z N-końcową grupą na powierzchni komórki (**a**), np.: glikoforyna, receptor LDL, ciężki łańcuch cząsteczki HLA-A, bądź z C-końcową grupą na powierzchni (**c**) jak receptor transferyny. Inne białka mają kilka α-helis mocujących je w dwuwarstwie, jak białko 3 prążka elektroforetycznego erytrocytu (**d**) albo rodopsyna (**e**). Białka mogą być także zamocowane w błonie nieprzechodzącą przez całą błonę α-helisą (**f**), jak cytochrom b5, albo dołączoną lipidową grupą mirystylową (**b** dół), np. białko Src bądź fosfatydyloinozytolową (**b** góra), jak białko Th-1 limfocytu. Reszty cukrowcowe zaznaczono (o).

Wbudowywanie białek przez fałdowanie łańcucha polipeptydowego

Inna hipoteza wbudowywania białek integralnych błony wynika z obserwacji, iż wspólną cechą białek integralnych jest ich mała rozpuszczalność w roztworach wodnych. Ta cecha białek w większym stopniu zależy od ich konformacji niż składu aminokwasowego. Sekwencje około 20 aminokwasów hydrofobowych są obecne w wielu białkach błonowych oraz rozpuszczalnych w wodnym środowisku cytoplazmy. Hipoteza zakłada, że białka przeznaczone do wbudowania w błonę w kontakcie z dwuwarstwą lipidową przyjmują konformację umożliwiającą translokację przez błonę (ryc. 6.9b). Przykładami takich białek mogą być: oksydaza cytochromowa, dehydrogenaza 3-fosforanu glicerolu, cytochrom b5, transferaza galaktozylowa. Białka te są dobrze rozpuszczalne w roztworach wodnych bez detergentu, ale mogą spontanicznie wbudować się do błony. Taki sposób wbudowywania łańcuchów polipeptydowych do błony określa się jako **fałdowanie łańcuchów zależne od błony**. Przedstawione wyżej hipotezy włączania białek integralnych do błon nie wykluczają się nawzajem i można je wytłumaczyć następującymi obserwacjami.



Rycina 6.8 Domena α-helisy w dwuwarstwie lipidowej. Hydrofobowe reszty aminokwasów helisy są skierowane do hydrofobowych reszt kwasów tłuszczowych lipidów. Helisa przechodząca w poprzek całej błony jest utworzona z ok. 20 aminokwasów (wg B. Alberts).



Rycina 6.9 Graficzne przedstawienie dwóch hipotez wbudowywania się białek do błony biologicznej: **a.** hipoteza kotranslacji, **b.** hipoteza fałdowania łańcucha polipeptydowego. Cylindrami zaznaczono hydrofobowe sekwencje aminokwasów.

Zarówno glikoforyna, jak i białka antygenów zgodności tkankowej mają N-koniec łańcucha polipeptydowego na powierzchni komórki, co świadczyłoby o przemieszczaniu się białka przez błonę podczas biosyntezy, czyli o kotranslacji. Inne białka mają na powierzchni C-koniec łańcucha polipeptydowego, co w tym przypadku raczej skłania do przyjęcia hipotezy o wbudowaniu bądź przemieszczaniu się tych białek przez fałdowanie.

Białka z kotwiczką lipidową: białka GPI, białka acylowane, białka prenylowane

Białka GPI (GPIAP, *GPI anchored proteins*) to białka powierzchniowe wiążące się z warstwą E błony plazmatycznej poprzez resztę glikozylofosfatydyloinozytolową (GPI). Glikozylofosfatydyloinozytol syntetyzowany jest w retikulum endoplazmatycznym. Początkowo białka GPI są syntetyzowane w retikulum endoplazmatycznym jako białka transbłonowe. W retikulum endoplazmatycznym następuje połączenie cząsteczki białka przy jego C-końcu z resztą GPI w reakcjach katalizowanych przez kompleks transamidazowy (proteoliza C-końcowego sygnałowego fragmentu białka i synteza wiązania amidowego pomiędzy cząsteczką białka a resztą GPI). W retikulum endoplazmatycznym białka GPI są sortowane, a następnie przenoszone do aparatu Golgiego w specyficznym transporcie w pęcherzykach COPII. W aparacie Golgiego reszta lipidowa białek GPI ulega modyfikacji, polegającej na zastąpieniu reszt nienasyconych kwasów tłuszczowych „tratwofilnymi" długołańcuchowymi resztami nasyconymi. W aparacie Golgiego białka GPI są sortowane i przenoszone jako tratwy w transporcie pęcherzykowym do warstwy apikalnej błon komórek nabłonka. Być może sortowanie białek GPI do warstwy apikalnej związane jest także z ich N-glikozylacją i aktywnością galektyny 3.

Białka GPI są zaangażowane między innymi w procesy przekazywania sygnałów poprzez błonę, sortowania białek i tworzenia mikrodomen błon komórkowych. Ich całkowite usunięcie prowadzi do śmierci w życiu płodowym. Brak w błonie erytrocytów dwóch białek GPI: CD55 i CD59, jest przyczyną napadowej nocnej hemoglobinurii.

Acylacja białek jest ich posttranslacyjną modyfikacją. Polega ona na kowalencyjnym przyłączeniu do białka cząsteczki kwasu tłuszczowego, w większości przypadków czternastowęglowego kwasu mirystynowego (mirystylacja) i szesnastowęglowego kwasu palmitynowego (palmitylacja). Mirystylację katalizuje N-mirystoilotransferaza, przenosząc resztę kwasu mirystynowego z myristoilo-CoA na końcową grupę NH_2 białka z utworzeniem wiązania amidowego. Wiązanie to jest trwałe, nie ulega hydrolizie przez cały czas trwania cząsteczki białka i zwiększa jego hydrofobowość, ale nie wystarcza, aby związać białko z błoną. Do wiązania białka z błoną konieczna jest druga cząsteczka lipidu,

np. kwasu palmitynowego, przyłączana do białka w wyniku palmitylacji. Palmitylacja to przeniesienie reszty kwasu palmitynowego z palmitoilo-CoA na grupę sulfhydrylową reszty cysteiny w białku z utworzeniem wiązania tioestrowego.

W odróżnieniu od mirystylacji, którą katalizuje jeden enzym, za ekspresję palmitoilotransferaz odpowiada u człowieka 25 genów. Palmitoilotransferazy są białkami transbłonowymi i różne ich izoformy występują w retikulum endoplazmatycznym, aparacie Golgiego i w błonie plazmatycznej. Palmitylacja jest odwracalną modyfikacją białek.

Usuwanie reszt kwasu palmitynowego katalizują tioesterazy. Odwracalna palmitylacja białek, np. H-Ras i N-Ras, decyduje o ich wymianie pomiędzy aparatem Golgiego a warstwą P błony plazmatycznej. W błonie plazmatycznej palmitylacja sprzyja występowaniu acylowanych białek we frakcji tratw lipidowych.

Prenylacja białek jest ich posttranslacyjną modyfikacją polegającą na przyłączeniu hydrofobowego izoprenowego fragmentu do grup sulfhydrylowych (hydrosulfidowych) reszt cysteiny w C-końcu białka z utworzeniem wiązania tioeterowego. Reakcje katalizują trzy występujące w cytoplazmie transferazy prenylowe: farnezylotransferaza i dwie geranylogeranylotransferazy, różniące się mechanizmem działania. Farnezylotransferaza (FT) przenosi 15-węglowy fragment farnezylu z difosfofarnezylu na resztę cysteiny fragmentu białka –C-a1-a2-X, gdzie C oznacza resztę cysteiny, a1 i a2 alifatyczne reszty aminokwasowe, a X resztę aminokwasową, od której zależy, czy modyfikowane białko ulegnie farnezylacji czy geranylogeranylacji w reakcji katalizowanej przez geranylogenarylotransferazę I (GGT- I).

Prenylowane białka wiążą się z warstwą P retikulum endoplazmatycznego, gdzie swoista proteaza odcina fragment –a1-a2-X, odsłaniając grupę karboksylową cysteiny, która z kolei ulega enzymatycznej metylacji. Prenylowane białka mogą wędrować w transporcie pęcherzykowym bezpośrednio do błony plazmatycznej lub pośrednio, dostając się najpierw do aparatu Golgiego. W aparacie Golgiego prenylowane białka mogą ulec dodatkowo palmitylacji, zwiększającej ich hydrofobowość.

Geranylogeranylotransferaza II (GGT-II), zwana także geranylogeranylotransferazą Rab, przenosi (zwykle) dwie cząsteczki genarylogenarylu na reszty cysteiny w C-końcowym fragmencie białek Rab. GGT-II nie rozpoznaje bezpośrednio białek Rab, a w reakcji prenylacji zaangażowane jest białko REP (*rab escort protein*). Są dwa modele współdziałania białek Rab, REP i GGT-II. W pierwszym nowo syntetyzowane białko Rab wiąże się z białkiem REP i taki kompleks jest rozpoznawany przez transferazę GGT-II związaną z difosforanem geranylogeranylu. Po prenylacji transferaza GGT-II odłącza się z kompleksu, natomiast REP pozostaje związane z białkiem Rab z przyłączoną resztą geranylogeranylową.

W alternatywnym modelu REP tworzy kompleks z transferazą GGT-II związaną z difosforanem geranylogeranylu, który rozpoznaje, wiąże i prenyluje białko Rab. Kompleks uwalnia GGT-II, a prenylowane białko Rab związane z białkiem REP, tak jak w poprzednim modelu, jest transportowane do błon komórkowych. W błonie plazmatycznej białka prenylowane (rozgałęziony łańcuch węglowodorowy, liczne wiązania podwójne) unikają mikrodomen w stanie ciekłym uporządkowanym. Prenylacja jest modyfikacją nieodwracalną, dokonywaną na cały czas trwania białka.

W komórkach ssaków około 2% proteomu to białka prenylowane. Prenylacja i uwarunkowane nią występowanie w warstwie P błony plazmatycznej są niezbędne do aktywności białek, takich jak Ras, Rho/Rac i Rab. Białka Ras nie tylko uczestniczą w przekazywaniu sygnałów z receptorów błony plazmatycznej do jądra komórkowego, warunkujących wzrost i różnicowanie się komórek, ale bardzo często ulegają mutacjom.

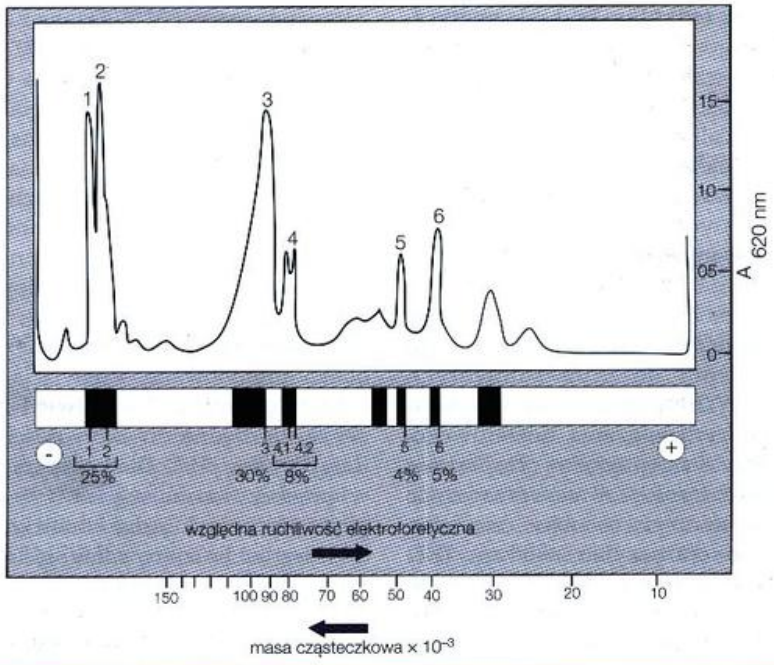
Mutacje takie prowadzą do permanentnie zaktywowanego białka i wynikającej z tego onkogenezy, jednak efekt ten można zahamować, stosując inhibitory prenylacji. Stąd ogromne zainteresowanie inhibitorami prenylacji białek.

Błona erytrocytu i szkielet błony

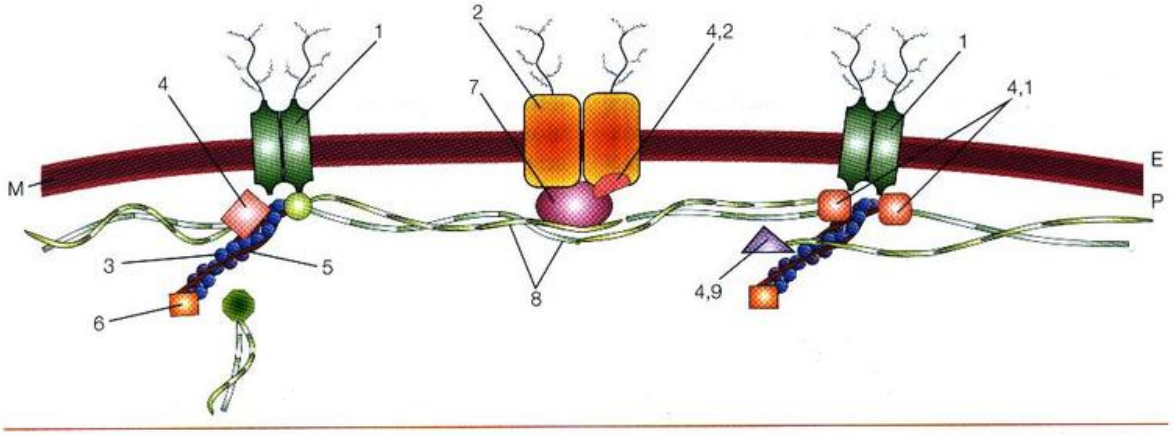
Jedną z najlepiej poznanych błon komórkowych jest błona erytrocytu. Przyczyniła się do tego łatwość otrzymania dużej liczby tych błon bez konieczności oddzielania ich od błon śródplazmatycznych. Erytrocyty utrzymują kształt dwuwklęsłej soczewki, podczas gdy większość komórek po zawieszeniu w środowisku wodnym ma kształt kulisty. Erytrocyty utrzymują ten kształt, mimo przeciskania się przez wąskie naczynia krwionośne. Jest to możliwe dzięki rusztowaniu białek leżących pod błoną, zespolonych z białkami integralnymi błony. Warstwę tych białek nazywa się **szkieletem błony**, w odróżnieniu od cytoszkieletu, leżącego głębiej w komórce.

Elektroforeza białek błon erytrocytu

Analizę białek błon erytrocytu człowieka początkowo prowadzono za pomocą elektroforezy i stąd ich nazwy często pochodzą od usytuowania w elektroforogramach, np. białko 3 prążka (szczytu) (ryc. 6.10.). Można było wyróżnić wiele białek, z których dwa główne okazały się białkami integralnymi, a pozostałe stanowią powierzchniowe białka szkieletu błony erytrocytu (ryc. 6.11). Te białka integralne to glikoforyna i białko 3 prążka elektroforetycznego. Kilka białek, których rozdział elektroforetyczny przedstawia ryc. 6.10, odpowiada za ponad 70% masy erytrocytu, w tym około 850 białek błonowych erytrocytu u człowieka.



Rycina 6.10 Wynik elektroforezy solubilizowanych białek błony erytrocytu człowieka. Liczby u dołu rysunku oznaczają kolejne łańcuchy polipeptydowe oraz ich odsetkową zawartość (100% – wszystkie białka); por. z ryc. 6.11. A – front barwnika.



Rycina 6.11 Szkielet błony erytrocytu człowieka. Zaznaczono podstawowe białka, które oddziałują między sobą: glikoforynę (1) oddziałującą z aktyną (3), tropomiozyną (5), adducyną (4), tropomoduliną (6), białkami 4,1 i 4,9 oraz białko 3 prążka (wymiennik anionów) (2) oddziałujące z ankiryną (7), białkiem 4,2 i łańcuchami α i β spektryny (8). E i P są warstwą lipidową zewnętrzną i cytoplazmatyczną błony komórkowej (M) (zmodyfikowano wg E.J. Luna, A.L. Hitt).

Białka integralne – glikoforyna i białko 3 prążka (pasma) elektroforetycznego

Glikoforyna jest zbudowana ze 131 aminokwasów, a w dwuwarstwie lipidowej jest zamocowana jednym odcinkiem α-helisy zbudowanej z 23 aminokwasów (ryc. 6.7a). Jej część powierzchniowa ma przyłączone liczne łańcuchy cukrowcowe, stanowiące około połowy masy cząsteczkowej glikoforyny. **Białko 3 prążka (szczytu)** jest kanałem dla anionów, jonów dwuwęglanowych (HCO_3^-) i chlorkowych (Cl^-) w błonie erytrocytu. Dwie cząsteczki, czyli dimer, tworzą kanał. To większe od glikoforyny białko jest zakotwiczone w błonie 14 odcinkami α-helis (ryc. 6.7 d), a N-koniec łańcucha oraz C-koniec wystają na powierzchni cytoplazmatycznej. Białko 3 prążka jest glikoproteiną, której łańcuchy cukrowcowe są głównym nośnikiem antygenów układu ABH. Struktury antygenowe są tu identyczne jak spotykane w glikosfingolipidach.

Białka powierzchniowe powiązane z białkami integralnymi

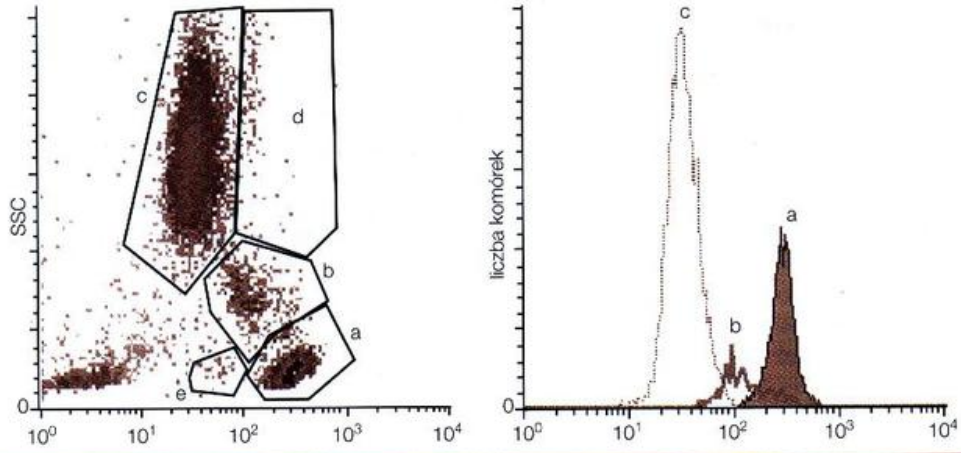
Największy udział wśród białek powierzchniowych ma **spektryna**, występująca w błonie erytrocytu w formie tetrameru zbudowanego z łańcuchów 220 i 240 kD. Spektryny tworzą dimery, mają kształt długich, około 100 nm, splatających się powrozów, biegnących równolegle do powierzchni błony i tworzących regularną sieć (ryc. 6.11.). Spektryna w regularnych odstępach jest zamocowana do białka 3 prążka za pomocą białka ankiryny (białko prążka 2.1). Do spektryny, również w regularnych odstępach, są dołączone dwa inne białka powierzchniowe: białko prążka 4.1 i F-aktyna, tworząca krótkie mikrofilamenty. Białko prążka 4.1 jest także połączone z glikoforyną.

KLINIKA

Takie powiązania białek szkieletu błony i białek integralnych zapewniają dobrą mechaniczną stabilność kształtu erytrocytu. U ludzi z genetycznie uwarunkowanymi nieprawidłościami budowy spektryny erytrocyty mają różne kształty (*pojkilocytoza*), często są eliptyczne (*eliptocytoza*) i łatwo podlegają hemolizie, co prowadzi do niedokrwistości. Warto dodać, że wiele komórek, np. neurony, limfocyty, w warstwie korowej cytoplazmy ma białka podobne do spektryny, które są nazywane **fodrynami**.

Białko integralne leukocytów – CD45

W błonach komórkowych leukocytów człowieka występuje białko integralne określane jako CD45, GP180, T200 albo **wspólny antygen leukocytów** (ang. *leukocyte common antigen*) (ryc. 6.12). Podobnie jak glikoforyna jest zamocowane jednym odcinkiem α-helisy w błonie, a odcinek powierzchniowy ma przyłączone liczne grupy cukrowcowe. Różna długość powierzchniowego odcinka jest przyczyną występowania izoform tego białka, które jest enzymem, białkową fosfatazą tyrozynową. Miejsce aktywne enzymu znajduje się w ewolucyjnie konserwatywnej domenie cytoplazmatycznej białka. W tym odcinku jest również miejsce wiązania fo-



Rycina 6.12 Cytometryczny zapis ekspresji białka CD45 na powierzchni leukocytów krwi człowieka. Objęte bramkami subpopulacje leukocytów mają różną ekspresję CD45: a – limfocyty, b – monocyty, c – neutrofile, d – eozynofile, e – bazofile, co porównano na histogramie.

dryny, z którą białko tworzy szkielet błony uzupełniony mikrofilamentami aktynowymi. Kompleks CD45 i fodryny zwiększa aktywność fosfatazową enzymu i przypisuje się mu udział w przekazywaniu sygnału niektórych aktywacji leukocytów. Ekspresja CD45 jest niższa w komórkach chłoniaków i jest to wykorzystywane w diagnostyce tych chorób oraz do odróżnienia komórek chłoniaka od prawidłowych limfocytów metodą cytometrii przepływowej.

Glikokaliks

Powierzchniowe domeny białek błonowych oraz lipidy błonowe mają przyłączone łańcuchy cukrowcowe. Powierzchnia komórki jest przez to pokryta warstwą oligosacharydów związanych z glikolipidami i białkami integralnymi. Warstwa tych łańcuchów cukrowcowych to **glikokaliks**. Warstwa ta chroni komórkę, a ponadto uczestniczy w oddziaływaniach między komórkami. Przykładem może być w procesie zapalenia oddziaływanie leukocytów krwi z komórkami śródbłonka w odpowiedzi obronnej (zob. rozdz. 11). Wstępnym etapem poprzedzającym przejście leukocytów z krwi do zagrożonej tkanki jest adhezja tych komórek do śródbłonka naczyń. Na powierzchni komórek śródbłonka naczyń tkanki zagrożonej pojawiają się integralne białka, **selektyny** (E i P). Wiążą one swoiste oligosacharydy na powierzchni leukocytów, które są tym sposobem zatrzymywane w tej okolicy i wywędrowują z naczyń do zagrożonej tkanki. Inne selektyny, selektyny L, pojawiają się na powierzchni leukocytów i oddziałują z oligosacharydami powierzchni komórek śródbłonka.

Transport cząstek przez błony biologiczne

Skład jonowy wewnątrz komórki i w środowisku, które ją otacza, jest różny. Białka i kwasy nukleinowe w komórce najczęściej noszą sumaryczny ładunek ujemny, są anionami. Ładunek ten zależy od grup fosforanowych oraz karboksylowych obecnych w tych cząsteczkach. Wewnątrz komórki znajdują się ponadto aniony dwuwęglanowe (HCO_3^-), chlorkowe (Cl^-), fosforanowe. Wewnątrzkomórkowe aniony są równoważone głównie jonami K^+. Jony bezpośrednio nie przenikają przez dwuwarstwę lipidową, ale są układy transportujące, których zadaniem jest utrzymanie równowagi jonowej. Jest to niezmiernie ważne dla życia komórki, gdyż w razie braku równowagi jonowej komórka pobiera wodę, nabrzmiewa i w końcu pęka. Przez błonę komórkową mogą również selektywnie przenikać cząsteczki niezjonizowane, konieczne do życia komórki, np. glukoza. Większość tych cząsteczek też nie dyfunduje przez dwuwarstwę lipidową. Specjalne białka umożliwiają transport tych cząsteczek oraz jonów przez barierę błony komórkowej (tab. 6.2).

Podstawowe cechy transportu przez błony biologiczne

W transporcie prostym, nie wymagającym nośników, dyfundują małe cząsteczki: woda (może też być jej transport ułatwiony kanałami, **akwaporynami**), mocznik, etanol, gazy, jak CO_2, O_2, NO. Podobnie dyfundują substancje dobrze rozpuszczalne w lipidach. W takim transporcie białka błonowe najczęściej nie biorą udziału. Ich udział jest natomiast konieczny w przypadku substancji hydrofilnych i obdarzonych ładunkiem elektrycznym. Cechy transportu prostego i transportu poprzez inne mechanizmy z udziałem białek błonowych przedstawiono w tabeli 6.3.

Transport ułatwiony białkami przenośnikowymi

Transport ułatwiony aminokwasów, cukrów, nukleozydów, jonów do komórki wymaga udziału białek błonowych, ale nie potrzeba do tego nakładu energii z zewnątrz. Cząsteczki przenikają przez błonę zgodnie z **gradientem** (kierunkiem) ich stężenia w poprzek błony, a jony zgodnie z potencjałem elektrycznym. W transporcie ułatwionym cząsteczki nie dyfundują przez dwuwarstwę lipidową bezpośrednio, ale biorą w tym udział integralne białka błonowe przenośnikowe. Wyróżnia się dwie grupy białek uczestniczących w dyfuzji ułatwionej: białka przenośnikowe oraz białka tworzące kanały.

Białka przenośnikowe swoiście wiążą określone cząsteczki, które mają przenieść przez dwuwarstwę lipidową. Następnie białko przenośnikowe zmienia swoją budowę (konformację), co pozwala przeniknąć transportowanej cząsteczce na przeciwną stronę błony, gdzie jest uwalniana.

Białka tworzące kanały stanowią w dwuwarstwie lipidowej otwarte pory, umożliwiające wolną dyfuzję różnych cząstek odpowiedniej wielkości i ładunku. Część kanałów może być zamknięta, a otwierana jest ligandem lub zmianą potencjału błony (kanały zależne od napięcia).

Tabela 6.2 Cząsteczki niezjonizowane i jony transportowane przez różne błony biologiczne

Rodzaj błony	Przykłady transportu cząsteczek i jonów
Błona komórkowa	aminokwasy, cukry, nukleozydy, Na^+, K^+, Ca^{++}
Wewnętrzna błona mitochondrialna	pirogronian, ADP, H^+/ATP
Błona lizosomowa	H^+

Tabela 6.3 Cechy mechanizmów transportu cząstek przez błony biologiczne; S – substancja przenoszona, transportowana (cyt. za: Podstawy cytofizjologii, Wyd. Nauk. PWN, Warszawa 1998)

Rodzaj transportu	Transport prosty	Transport ułatwiony	Transport aktywny
Linowa zależność transportu od gradientu stężenia S	+	–	–
Stereoswoistość	–	+	+
Współzawodniczenie podobnych przenoszonych S	–	+	+
Zapotrzebowanie na energię do transportu	–	–	+
Kierunek transportu S warunkowany gradientem stężenia	+	+	–

Przykład transportu aminokwasu do komórki

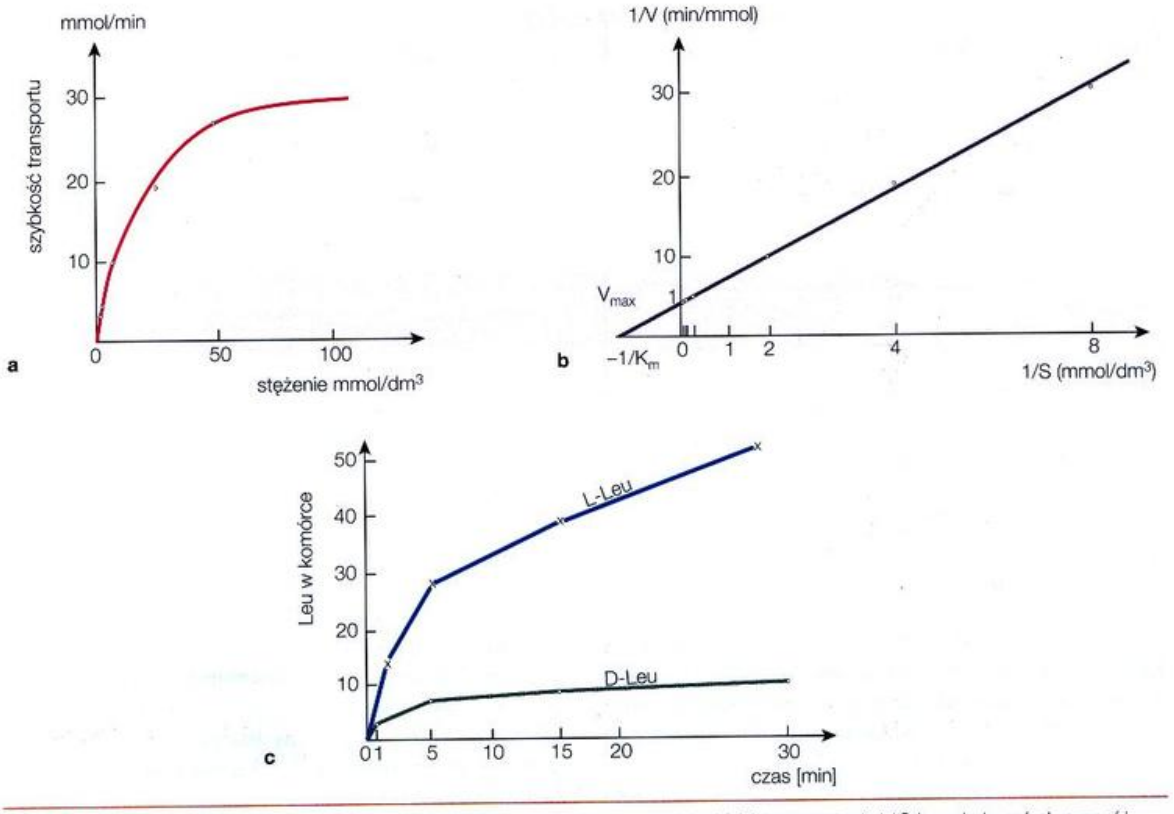
Kinetykę transportu ułatwionego, czyli przebieg transportu cząsteczek obserwowany w czasie, można prześledzić na przykładzie wnikania L-leucyny (L-Leu) do komórek raka wysiękowego Ehrlicha (ryc. 6.13). Transport ten zależy od różnicy stężeń L-Leu po obu stronach błony komórkowej i jest zgodny z gradientem stężenia. Można założyć, że stężenie L-Leu w komórce jest niskie i na stałym poziomie, bo aminokwas jest włączany do procesów metabolicznych. Zwiększanie stężenia L-Leu w otoczeniu komórki, w środowisku otaczającym, powoduje natomiast wzrost szybkości transportu (mmol/min) aminokwasu do komórki. Jak przedstawiono na ryc. 6.13a, nie jest to zależność prostoliniowa, ale krzywa „wysycenia". Przebieg krzywej wysycenia objaśnia się obecnością w błonie komórkowej pewnej liczby przenośników L-Leu, a maksymalna szybkość transportu nie może przekroczyć stanu, gdy wszystkie cząsteczki białka przenośnika są aktywne. Tę maksymalną szybkość transportu, V_{max}, określającą liczbę cząsteczek białka przenośnika L-Leu w błonie komórkowej, wyznacza się, wykreślając **prostą Lineavera-Burka** (ryc. 6.13b). Z prostej można również odczytać stałą K_m, określającą powinowactwo przenośnika do L-Leu. Transport przenośnikiem w tym przypadku jest stereoswoisty. Transport jest nasilony dla L-Leu, ale słaby dla D-Leu, co oczywiście ma związek z powinowactwem białka przenośnika do formy aminokwasu.

Transport glukozy do komórki oraz z komórki

Glukoza jest jednym z podstawowych źródeł energii w komórce, stąd jej transport musi odbywać się sprawnie. Są dwie rodziny białek transportujących glukozę przez błony komórkowe. Pierwszą jest rodzina białek przenośnikowych oznaczana skrótem **GLUT** (ryc. 6.15). Transport ułatwiony białkiem GLUT jest „wysycalny", stereoswoisty i dwukierunkowy. Drugą rodziną białek transportujących glukozę jest jelitowy kotransporter Na^+/glukoza **SGLT1**, wykorzystujący elektrochemiczny gradient Na^+ do transportu aktywnego glukozy i galaktozy wbrew gradientowi stężenia. Ten przenośnik bierze udział w pobieraniu glukozy i galaktozy z jelita cienkiego (ryc. 6.14) i w reabsorpcji glukozy z moczu w nefronie (kanaliki proksymalne).

Większość komórek zwierzęcych ma w błonie komórkowej integralne białko przenośnikowe z rodziny GLUT, które bierze udział w transporcie ułatwionym D-glukozy do komórki (tab. 6.4). Prawidłowe stężenie glukozy w osoczu krwi, 0,1 g/100 ml, jest dużo wyższe niż wewnątrz komórki, gdzie glukoza natychmiast jest fosforylowana. Stąd gradient stężenia najczęściej jest z osocza do komórki. Transport glukozy może również odbywać się w kierunku przeciwnym, np. z hepatocytów do osocza krwi podczas głodzenia. Wśród przenośników D-glukozy dobrze jest poznany przenośnik **GLUT1** w błonie erytrocytów.

Erytrocyt całą energię czerpie z glikolizy. Przenośnik ma masę około 55 kD oraz jeden łańcuch N-oligosacharydowy od strony środowiska i jest za-

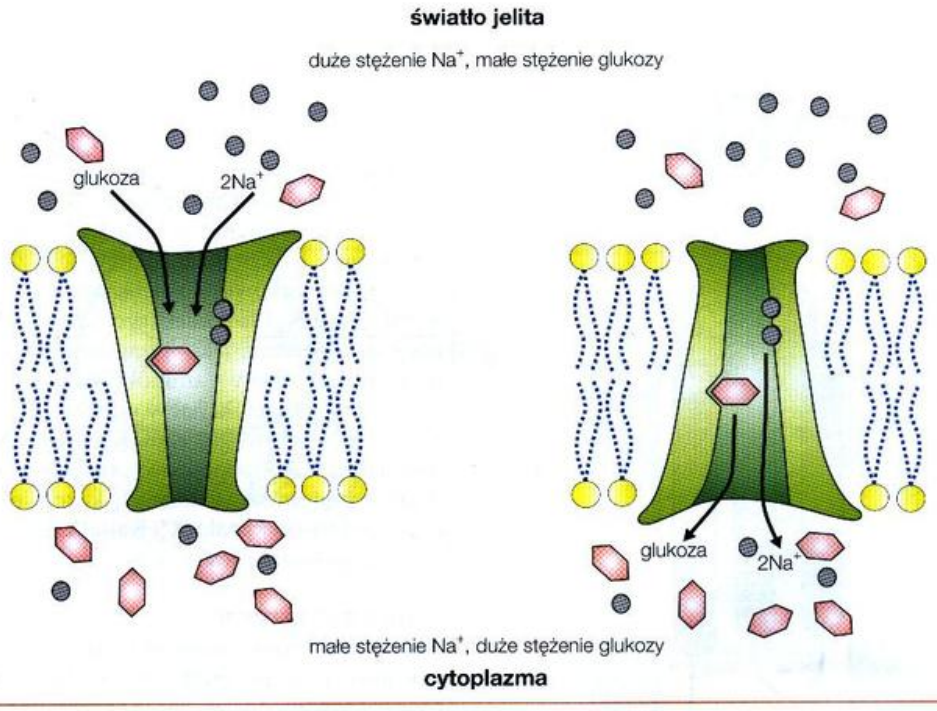


Rycina 6.13 Transport L-leucyny do komórek raka wysiękowego Ehrlicha: **a.** szybkość (V) transportu 1-14C Leu do komórek przy różnych stężeniach substratu w środowisku; **b.** wykres wyników przedstawionych w **a** wg Lineavera-Burka pozwalający odczytać maksymalną szybkość transportu (V_{max}) oraz stałą Michaelisa (K_m). V_{max} informuje o liczbie cząsteczek przenośnika obecnych w błonie komórkowej, a K_m – o powinowactwie L-Leu do przenośnika; **c.** porównanie gromadzenia w komórkach L-Leu i D-Leu obserwowane w czasie (wg Christensena i wsp. 1963).

mocowany w dwuwarstwie lipidowej 12 α-helisami. Każda helisa składa się z łańcucha 21 aminokwasów. Te aminokwasy układają się hydrofobowymi resztami w kierunku warstwy lipidowej, tworząc 7 zewnętrznych domen przenośnika, a 5 domen z hydrofilnymi resztami aminokwasów stanowi wnętrze kanału do wiązania glukozy (ryc. 6.15). Innym dobrze poznanym przenośnikiem glukozy jest białko integralne **GLUT4**, jedno z białek biorących udział w transporcie ułatwionym heksoz do różnych typów komórek zależnych od insuliny. W komórkach mięśniowych i tłuszczowych pod wpływem insuliny następuje szybkie przemieszczenie przenośników glukozy GLUT4 z endosomów, pęcherzyków położonych pod błoną komórkową, do błony komórkowej (ryc. 6.16). Takie 30–40-krotne zwiększenie liczby przenośników w błonie komórkowej powoduje gwałtowne przyspieszenie transportu glukozy do komórki. W komórkach tłuszczowych przyspieszenie transportu glukozy może dodatkowo zwiększyć się przez podwyższenie powinowactwa przenośników do glukozy indukowane insuliną.

KLINIKA

W **cukrzycy** (***diabetes***) typu I występującej w wieku młodzieńczym brak wydzielania insuliny przez komórki β wysp trzustkowych prowadzi do gorszego wykorzystania glukozy, która wtedy w wyższym stężeniu pozostaje w osoczu i jest wydalana z moczem (cukromocz). Badanie cukromoczu jest jednym z najprostszych testów diagnostycznych. W starszym wieku może pojawić się cukrzyca typu II, oporna na insulinę. Niedostateczna odpowiedź na insulinę w cukrzycy typu II może być wywołana różnymi przyczynami (ryc. 6.16). Prowadzi to jednak do zmniejszenia przemieszczania GLUT4 na powierzchnię komórki lub mniejszej aktywacji przenośnika, co upośledza wykorzystanie glukozy przez komórkę.



Rycina 6.14 Aktywny kotransport glukozy i jonów Na^+. Transporter wiąże i przenosi do komórki jedną cząsteczkę glukozy i dwa jony sodu. Transport jonów Na^+ odbywa się zgodnie z gradientem stężenia, a glukozy przeciw gradientowi.

W komórkach kanalików nerkowych proksymalnych przenośnik glukozy jest usytuowany na boczno-podstawnych powierzchniach błony komórkowej. Uważa się, że bierze udział w transporcie zwrotnym cukru z moczu pierwotnego do krwi. W hepatocytach transportuje natomiast glukozę z komórki do środowiska podczas glikogenolizy w okresie głodzenia oraz do cytoplazmy komórki, gdy stężenie glukozy we krwi jest podwyższone. W komórkach nowotworowych obserwuje się większą liczbę transporterów GLUT. Glikolityczny metabolizm w tych komórkach jest jedną z charakterystycznych cech nowotworu.

Transport adenozyny i deoksyadenozyny

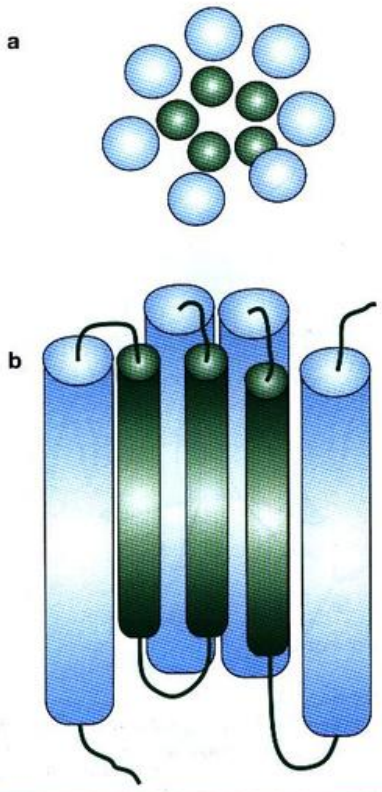
KLINIKA

Nukleozydy deoksypuryn, np. deoksyadenozyna, wnikają do komórki z udziałem wydajnego układu transportującego. Przez ten układ do komórki wnika również 2-chlorodezoksyadenozyna (2CdA, kladribina), lek stosowany w leczeniu białaczek (zob. rozdz. 13). W komórce nukleozydy są wykorzystane do biosyntezy DNA po uprzedniej fosforylacji do 5′-monofosforanu i dalej do trójfosforanu z udziałem kinazy deoksycytydyny (dCK) (ryc. 6.17). Wbudowana do DNA często dzielących się komórek białaczkowych kladribina, będąca nieprawidłową zasadą, uruchamia mechanizmy reperacji DNA, a ponieważ w tym przypadku reperacja nie może być skuteczna, dochodzi do indukcji apoptozy.

Nukleozydy puryn również mają białka wspomagające transport ułatwiony do komórek (ryc. 6.18). Budowa białka przenośnikowego adenozyny została opisana w błonie komórkowej drobnoustroju *Trypanosoma brucei*. To białko przenośnikowe ma 10 α-helis zakotwiczających je w błonie komórkowej. Wyróżniono dwa podobne transportery: P1 i P2. P1 przenosi adenozynę i inozynę do komórki, a P2 – adenozynę, adeninę, dipirydamol oraz tlenek melarsenu (lek zawierający arsen) do komórki. Ten ostatni jest lekiem wykorzystywanym w leczeniu zakażeń *Trypanosoma*, blokującym transport adenozyny, której drobnoustrój nie potrafi wytwarzać.

Białka tworzące kanały jonowe

W komórkach ssaków są stale utrzymywane gradienty jonowe przez błonę komórkową (ryc. 6.19), a transport jonów odbywa się przez kanały jonowe. Jak wspomniano, białka tworzące kanały wystę-



Rycina 6.15 Przenośnik D-glukozy erytrocytu człowieka: **a.** widok z kierunku prostopadłego do powierzchni błony, koła oznaczają poprzeczne przekroje przez domeny łańcucha polipeptydowego biegnące w błonie, zewnętrzne, jasne o charakterze hydrofobowym i wewnętrzne, o charakterze amfipatycznym; **b.** przekrój przez błonę, na którym przedstawiono tylko 4 hydrofobowe domeny i 3 amfipatyczne. Pozostałych 5 domen (razem jest 12) nie uwidoczniono. (wg Mueckler i wsp. 1985).

pują jako otwarte pory w dwuwarstwie lipidowej, przez które przenikają jony o odpowiedniej wielkości i ładunku. Dobrze są scharakteryzowane białka tworzące kanały jonowe w błonie komórkowej dla jonów K^+, Na^+ oraz Ca^{2+}. Występują we wszystkich komórkach, ale zostały szczególnie dokładnie zbadane w komórkach nerwowych i mięśniowych, gdzie ich regulowane otwieranie i zamykanie warunkuje przewodzenie sygnałów elektrycznych.

Białka tworzące wspomniane kanały należą do jednej rodziny. **Kanał jonowy K^+** jest utworzony z czterech zasocjowanych, identycznych łańcuchów białkowych. Każdy z łańcuchów jest zamocowany w błonie komórkowej 6 α-helisami, a od strony cytoplazmy mają N- i C-koniec (ryc. 6.20). Transbłonowa α-helisa oznaczana jako 4 zawiera liczne dodatnio naładowane reszty aminokwasowe, stanowiące czujnik otwierający kanał w odpowiedzi na zmiany potencjału błonowego. **Kanał jonowy Na^+** buduje jeden łańcuch polipeptydowy, mający cztery powtarzające się domeny, z których każda jest podobna do podjednostki kanału K^+. **Kanał Ca^{2+}** jest zbliżony budową do kanału Na^+.

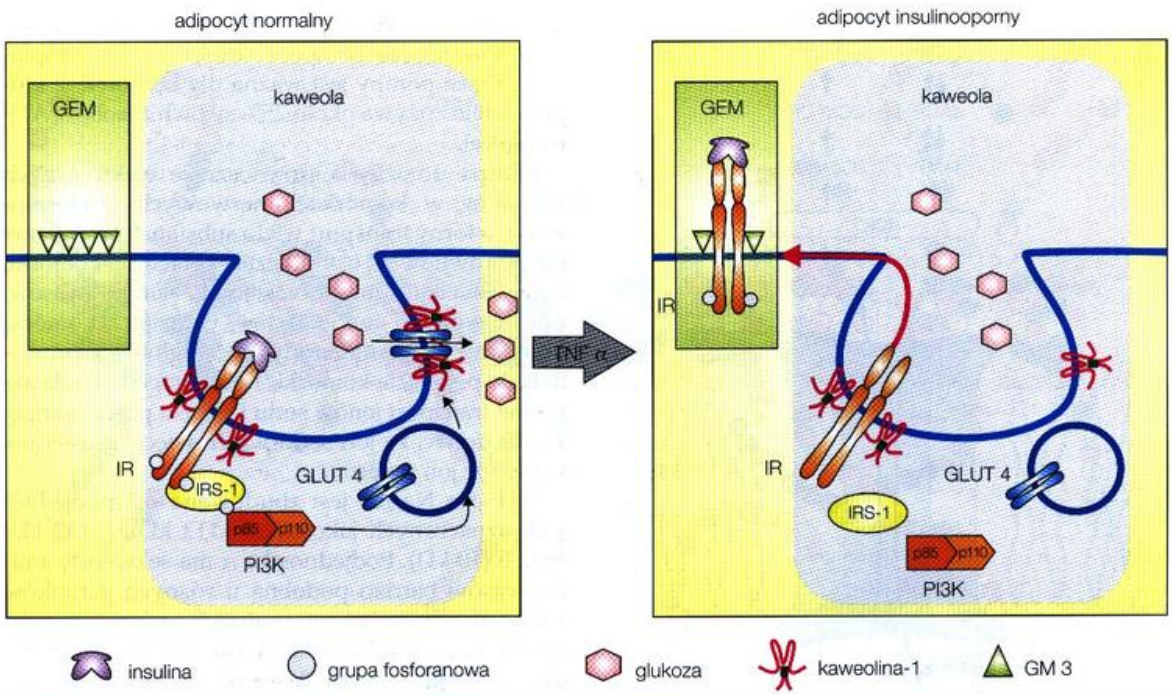
Transport aktywny

Transportem aktywnym określa się przenoszenie substancji przeciw gradientowi elektrochemicznemu, co wymaga dostarczenia energii (tab. 6.3). Definicja nie jest idealna, ale w większości przypadków można odróżnić transport wymagający dostarczenia energii przez komórkę. Dobrze poznane są trzy mechanizmy transportu aktywnego:

1) translokacja grupowa, którą obserwuje się u niektórych bakterii (nie będzie tutaj omawiana),
2) transport aktywny pierwotny, w którym dochodzi do utworzenia nowych wiązań kowalencyjnych w białku przenośnika; energia do transportu jest zużywana do **zmiany konformacyjnej białka przenośnika**,
3) transport aktywny wtórny, w którym aktywnie transportowany substrat pierwszy, np. Na^+, **tworzy gradient potencjału elektro-**

Tabela 6.4 Przykłady lokalizacji i funkcji białek rodziny GLUT ułatwiających transport D-glukozy do komórek u ssaków

Oznaczenie transportera	Komórka (przykład)	Lokalizacja i funkcje
GLUT1	erytrocyt	w tkankach płodowych i komórkach hodowanych *in vitro*, w nerce i jelicie grubym dorosłych
GLUT2	wątroba	na podstawnobocznej błonie komórkowej hepatocytów, w komórkach β trzustki, w jelicie cienkim i nerce
GLUT3	neurony	w mózgu, łożysku, jądrze (*testis*)
GLUT4	komórki mięśniowe, adipocyty	uczestniczy w zależnym od insuliny pobieraniu glukozy do komórek mięśnia szkieletowego, sercowego i komórek tłuszczowych
GLUT5	komórki nabłonkowe jelita cienkiego, plemniki człowieka	transport fruktozy w jelicie cienkim, nerce, mięśniu szkieletowym, adipocytach, mózgu, jądrze



Rycina 6.16 Schemat regulacji aktywności receptora insulinowego przez składniki domen błonowych wg Inokuchiego (*Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci. 2011, 87, 179–98*). Wzrost zawartości gangliozydu GM3 w błonach komórkowych pod wpływem TNFα uwalnianym, np. w odczynie zapalnym, powoduje przemieszczenie IR poza kaweole, do domen bogatych w glikosfingolipidy. Brak kontaktu z kaweoliną, białkiem kaweoli, w tym usytuowaniu powoduje redukcję autofosforylacji IR i ograniczenie transportu glukozy do komórki. IR – receptor insulinowy; GLUT4 – transporter glukozy; IRS-1 – substrat receptora insulinowego-1; PI3K – kinaza 3-fosfatydyloinozytolu; GEM – (ang. *glycosphingolipid enriched microdomains*) mikrodomeny bogate w glikosfingolipidy; GM3 – gangliozyd, sjalozylolaktozyloceramid; TNF-α – czynnik martwicy nowotworów α.

chemicznego, warunkujący transport innego substratu, np. cukru, aminokwasu, zgodnie z tym gradientem.

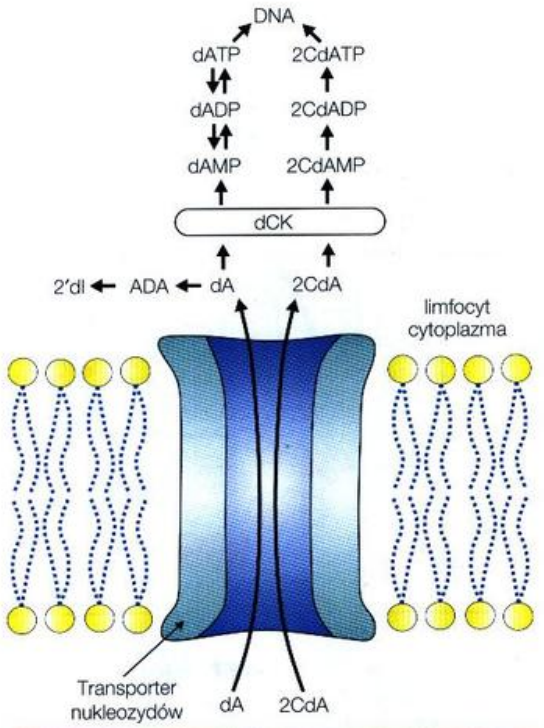
Swoisty transport tylko jednego rodzaju cząsteczek nazywa się **uniportem**. Bywa jednak tak, że transport dwóch różnych cząstek jest od siebie wzajemnie uzależniony (**kotransport**) i albo odbywa się w tym samym kierunku, na tę samą stronę błony, wtedy jest to **symport**, albo w kierunkach przeciwnych, co określa się jak **antyport**. Jak już wspomniano, w jelicie cienkim i nefronie odbywa się symport $2Na^+$/glukoza z udziałem białka SGLT1 (ryc. 6.14).

Wymiennik jonowy to układ, w którym są wymieniane jony przez błonę (antyport) z udziałem białka błonowego. Przykładem wymiennika jest transport Na^+/H^+, w którym białko wymiany tych jonów reguluje pH wewnątrz komórki (ryc. 6.21 b).

W błonie komórkowej (sarkolemie) komórek **mięśnia sercowego** znajduje się ważny wymiennik Na^+/Ca^{2+} (ryc. 6.21 a). W tym układzie w spoczynku są wymieniane trzy jony Na^+ płynące do komórki na jeden jon Ca^{2+} płynący na zewnątrz (od komórki). Transport 3 ładunków elektrycznych do komórki i dwóch z komórki generuje prąd elektryczny, którego pomiar może być bezpośrednią miarą aktywności wymiany. W czasie pobudzenia komórki prowadzącego do depolaryzacji sarkolemy następuje odwrócenie kierunku wymiany jonów: jony wapniowe wnikają do komórki, a sodowe wędrują na zewnątrz. Napływ jonów Ca^{2+} do cytoplazmy aktywuje uwalnianie dalszej porcji jonów Ca^{2+} z siateczki śródplazmatycznej (sarkoplazmatycznej), co prowadzi do skurczu komórki mięśnia sercowego. Wstępny napływ jonów Ca^{2+} powoduje więc uwolnienie Ca^{2+} z magazynów wewnątrz komórki i skurcz całej komórki.

Pompa sodowa (Na^+-K^+) – przykład aktywnego transportu pierwotnego

Stężenie jonów Na^+ poza komórką jest 14,5 razy wyższe niż wewnątrz komórki (10 mM). Odwrotnie jest z jonami K^+, których stężenie wewnątrz komórki (140 mM) jest 28 razy wyższe niż poza komórką



Rycina 6.17 Porównanie transportu i przemian w komórce dezoksyadenozyny (dA) i 2-chlorodeoksyadenozyny (2CdA, kladribiny), leku stosowanego w leczeniu białaczek. Kladribina jest szczególnie skuteczna w leczeniu białaczki limfatycznej włochatokomórkowej. Oporność 2CdA na dezaminację w limfocycie powoduje wybiórczą syntezę 2-CdA-DNA, prowadzącą do apoptozy tych komórek. dCK – kinaza deoksycytydyny, ADA – deaminaza adenozyny, 2'dI – 2'''-deoksyinozyna.

(ryc. 6.19). Utrzymanie tych różnic stężenia jonów po obu stronach błony komórkowej wymaga nakładu energii pochodzącej bezpośrednio z hydrolizy ATP.

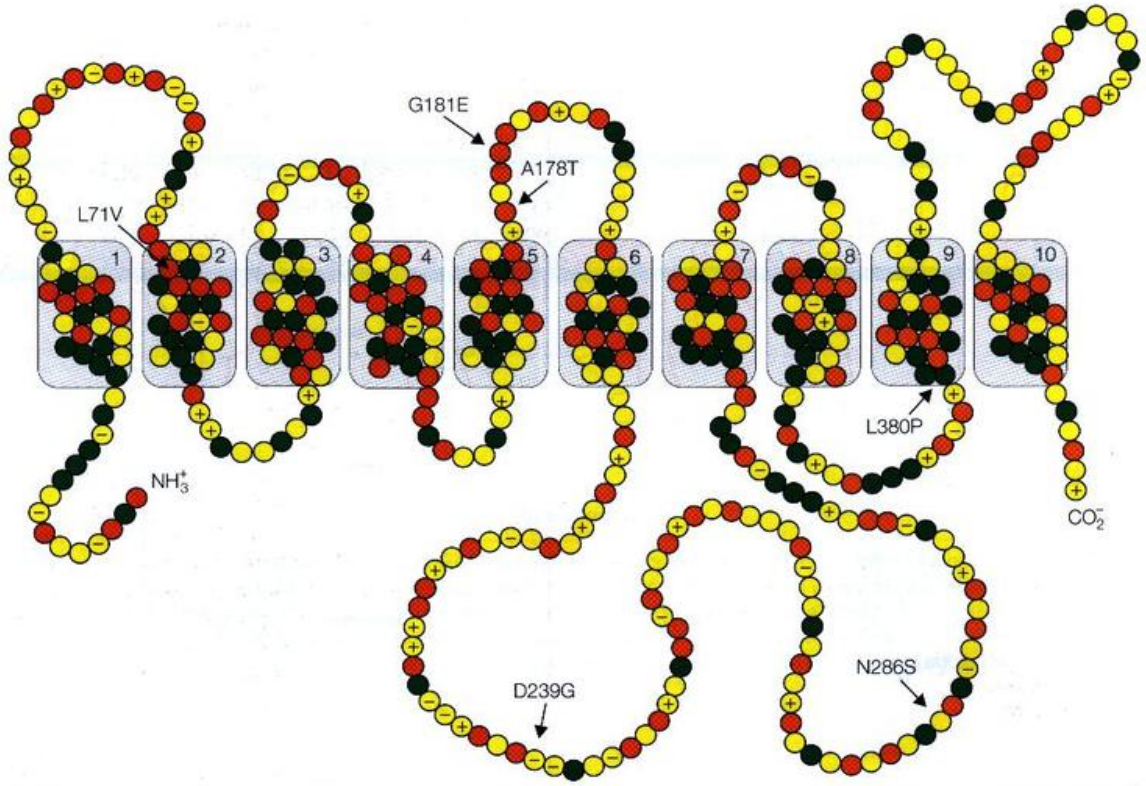
Układ utrzymujący te gradienty stężeń nazywa się **pompą sodową (Na^+-K^+)**. Proces transportu wiąże się ze zmianami konformacji białka będącego pompą; najpierw jony Na^+ są wiązane w miejscach o dużym do nich powinowactwie od strony cytoplazmy (ryc. 6.22). Aktywuje to hydrolizę ATP i fosforylację pompy, doprowadzając do zmiany konformacji białka. Zmiana taka przesuwa miejsce wiązania jonów Na^+ ku zewnątrzkomórkowej stronie błony oraz zmniejsza powinowactwo do jonów Na^+, które są uwalniane poza komórką. Jednocześnie w pompie na powierzchni komórki pojawiają się miejsca silnie wiążące K^+, co wywołuje hydrolizę grupy fosforanowej białka pompy. Hydroliza ta powoduje drugą zmianę konformacji białka przenośnika, która przesuwa miejsce wiązania K^+ do wnętrza komórki i zmniejsza powinowactwo do jonów K^+, tak że są one uwalniane do cytoplazmy. Praca pompy jest ważna dla komórek, z których wiele zużywa około 25% swoich zasobów ATP na ten cel.

Pompa umożliwia przenoszenie elektrycznych sygnałów w komórkach nerwowych i mięśniowych, wtórny transport wielu substancji oraz utrzymanie równowagi osmotycznej i objętości komórki. Duże stężenie makrocząsteczek, aminokwasów, nukleozydów i nukleotydów wewnątrz komórki powoduje wnikanie wody, co mogłoby doprowadzić do pęknięcia komórki. Temu przeciwdziała aktywny transport jonów sodu i potasu przez pompę. Warto dodać, że jon sodu wiąże więcej cząsteczek wody niż jon potasu.

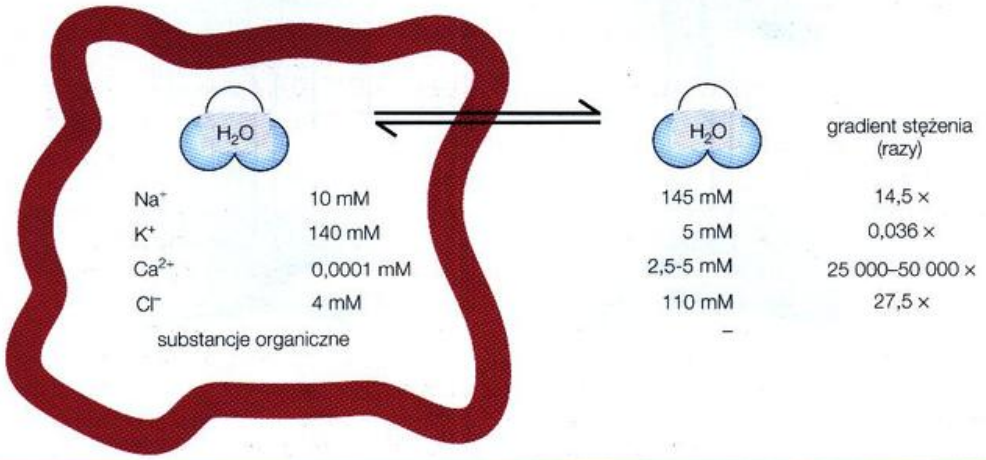
ATP-aza Na^+-K^+ jest zbudowana z 3 podjednostek oznaczanych jako α (ok. 113 kD), β (35 kD) oraz δ (10 kD). Podjednostka α ma sekwencję aminokwasów bardzo podobną u różnych gatunków zwierząt, co świadczy o dużej zachowawczości ewolucyjnej podjednostki i dużym jej znaczeniu dla działania pompy. W tej podjednostce leży sekwencja aminokwasów zawierająca Asp372, ważną dla wiązania Mg^{++}ATP. Podjednostka α jest zakotwiczona w dwuwarstwie lipidowej 10 α-helisami, a podjednostka β – jedną. Ta ostatnia podjednostka ma aż 3 mostki dwusiarczkowe na powierzchni komórki, które są ważne dla aktywności enzymatycznej ATP-azy. **Glikozydy nasercowe**, czasem podawane przez kardiologów w leczeniu zaburzeń rytmu serca, wiążą się z wszystkimi trzema podjednostkami enzymu.

Aktywny transport jonów Ca^{++}

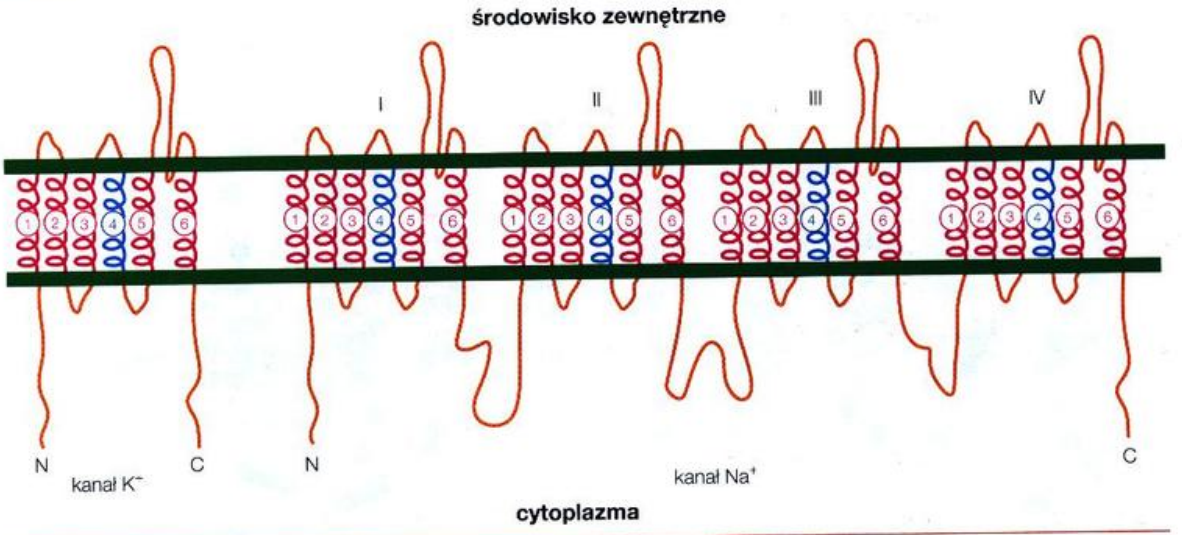
Aktywny transport jonów Ca^{++} przez błonę komórkową, zwany **pompą Ca^{++}** (ATP-azą Ca^{++}), strukturalnie podobną do pompy Na^+-K^+, również wymaga energii z ATP. Pompa bardzo aktywnie usuwa jony Ca^{++} z cytoplazmy komórki i stąd stężenie tych jonów (0,1μM) jest ponad 10 000 razy niższe niż poza komórką (ryc. 6.19). Przejściowy wzrost stężenia Ca^{++} wewnątrz komórki ma ważne znaczenie dla sygnalizacji wewnątrzkomórkowej oraz skurczu mięśniowego. Uważa się, że w komórkach mięśnia sercowego pompa Ca^{++} wbudowana w sarkolemę (błonę komórkową) ma mniejsze znaczenie w skurczu niż pompa Ca^{++} w błonach śródplazmatycznych (sarkoplazmatycznych) (ryc. 6.23). Pompa w błonach śródplazmatycznych przyczynia się do magazynowania jonów Ca^{++} wewnątrz kanalików sarkoplazmatycznych (ER), a więc wewnątrz komórki, co w pewnym stopniu uniezależnia



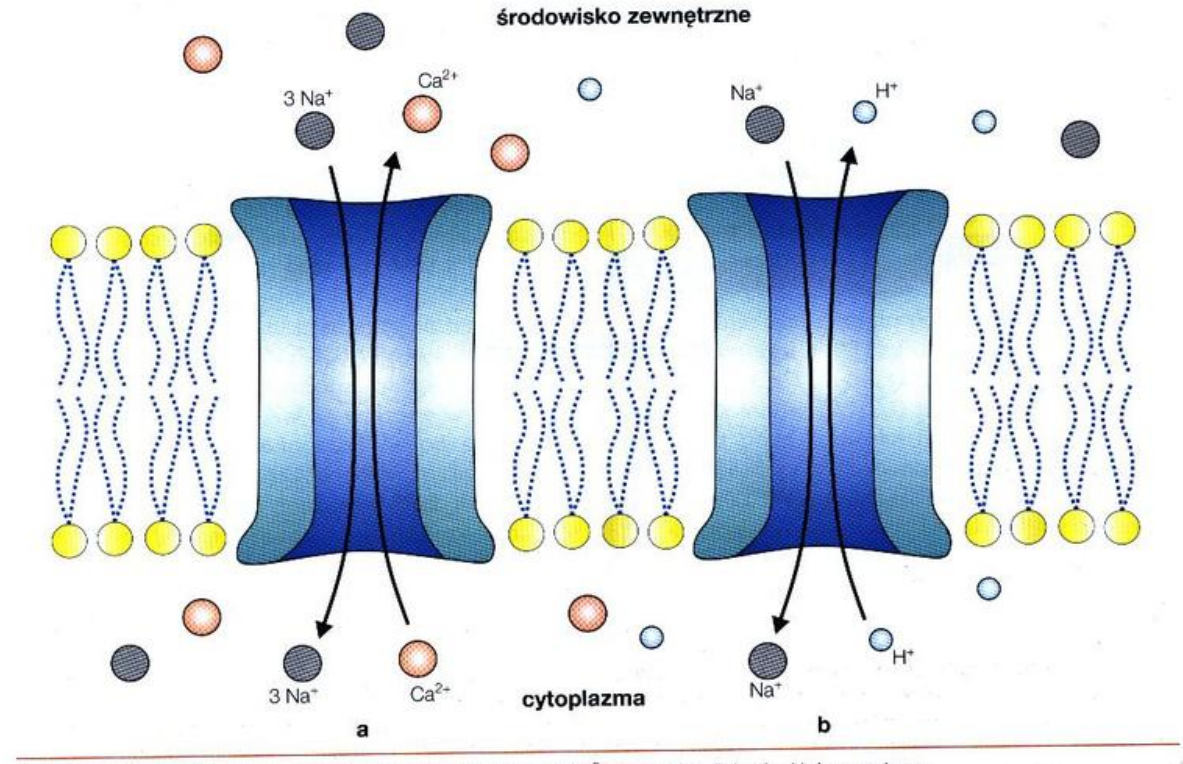
Rycina 6.18 Budowa transportera nukleozydów w błonie komórkowej *Trypanosoma*. (zmodyfikowane wg Maser i wsp., Science 1999).



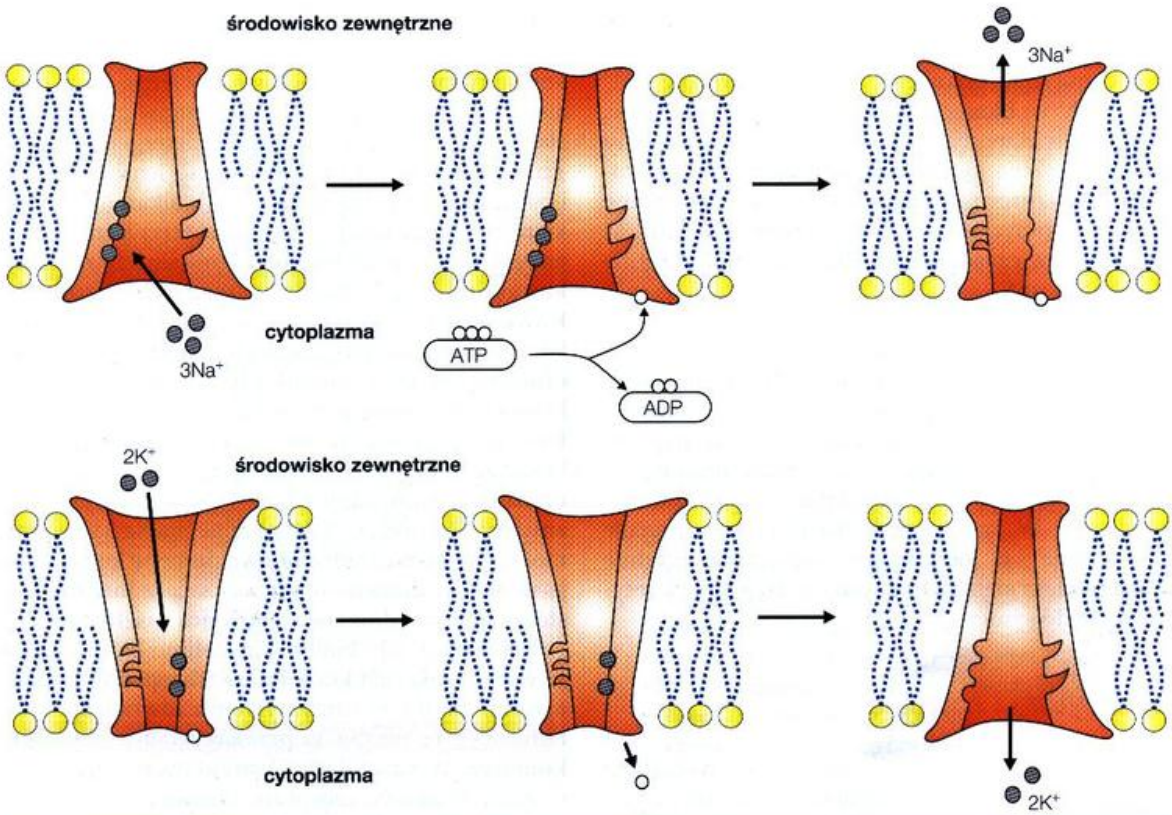
Rycina 6.19 Gradienty jonowe w poprzek błony komórkowej w typowej komórce ssaka. Stężenie jonów Na^+ i Cl^- jest duże poza komórką, a stężenie jonów K^+ jest większe wewnątrz komórki niż poza nią. Stężenia jonów, wyrównując ciśnienie, zapobiegają napływowi wody do komórki osmotycznej.



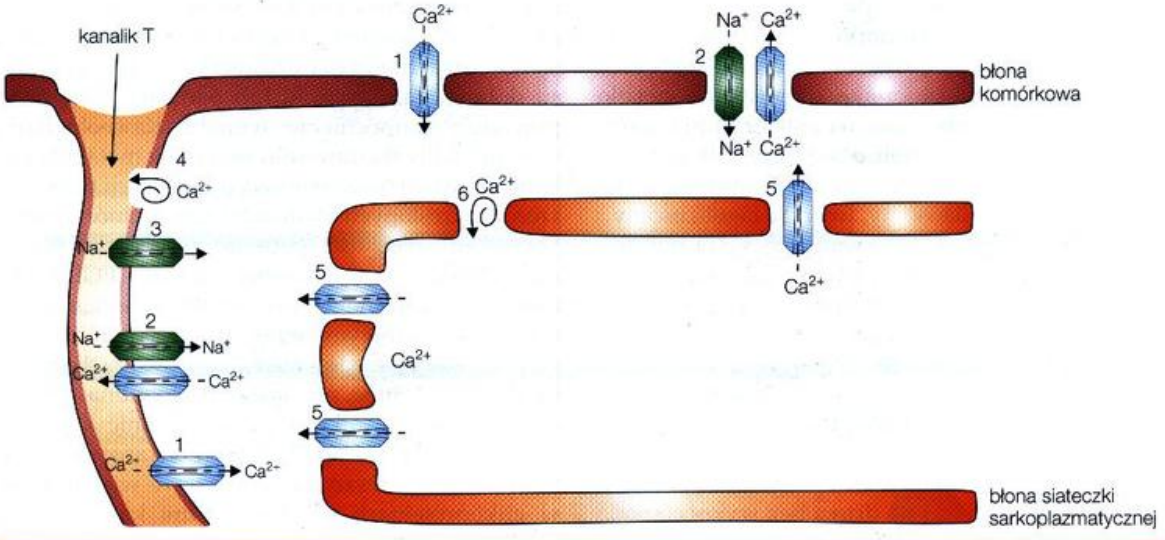
Rycina 6.20 Budowa kanałów kationowych otwieranych napięciem (*voltage-gated*). Kanały dla jonów: K^+, Na^+, Ca^{2+}, są rodziną podobnych białek. Kanał K^+ jest utworzony przez skupienie czterech identycznych podjednostek (domen), z których jedną przedstawiono z lewej strony ryciny. Kanał Na^+ tworzy jeden łańcuch polipeptydowy z powtarzających się czterech domen, każda z nich jest podobna do podjednostki kanału K^+. Kanał Ca^{2+} jest bardzo podobny do kanału Na^-. α-helisa numer 4 zawiera liczne aminokwasy z ładunkiem (+) i jest sensorem napięcia otwierającym kanał w odpowiedzi na zmiany potencjału błony.



Rycina 6.21 Wymienniki jonowe: **a.** wymiennik jonów Na^+ na jony Ca^{2+}, **b.** wymiennik jonów Na^+ na protony.



Rycina 6.22 Model działania pompy sodowej; opis w tekście.



Rycina 6.23 Rozmieszczenie w błonie komórkowej i błonach siateczki sarkoplazmatycznej (RE) głównych elementów wpływających na stężenie jonów Ca^{2+} w cytoplazmie podczas skurczu i rozkurczu komórki mięśnia sercowego. 1 – kanał wapniowy, 2 – wymienniki Na^+- Ca^{2+} w błonie komórkowej, blokowane solami Na^+ (zob. ryc. 6.21), 3 – kanały Na^+, 4 – ATP-aza wapniowa sarkolemy, 5 – kanały uwalniające Ca^{2+} z retikulum sarkoplazmatycznego, blokowane rianodyną, 6 – ATP-aza Ca^{2+} retikulum sarkoplazmatycznego, blokowana thapsigarginą (zmodyfikowane wg B. Lewartowskiego, pr. niepubl.).

skurcze tej komórki od aktualnego stężenia jonów Ca^{++} obecnych w jej otoczeniu. Po pobudzeniu komórki mięśnia sercowego, otwarcie kanałów Ca^{++} obecnych w błonach sarkoplazmatycznych (tzw. receptorów rianodynowych) powoduje gwałtowny wzrost stężenia jonów Ca^{++} w cytoplazmie i prowadzi do skurczu. W spoczynku cytoplazmatyczne stężenie wolnych jonów Ca^{++} wynosi około 10^{-7} M (0,1μM), a w czasie pobudzenia wzrasta 10-krotnie do około 1 μM.

Aktywny transport jonów H^+

Strukturalnie odmienne od pomp Na^+ i Ca^{2+} pompy protonowe transportują jony H^+ do wnętrza lizosomów i endosomów, co aktywuje zawarte tam proenzymy. Jeszcze inny typ pompy protonowej pracuje w wewnętrznej błonie mitochondriów (zob. rozdz. 9). W tych przypadkach pompa pracuje „odwrotnie", tj. jony są przemieszczane zgodnie z gradientem elektrochemicznym, co jest wykorzystywane do syntezy ATP.

Endocytoza i kaweole

Pobieranie do komórki substancji otoczonych błoną pęcherzyków nosi nazwę endocytozy. Są różne mechanizmy endocytozy. Włączanie do komórek stałych cząstek, takich jak: bakterie, komórki w apoptozie, fragmenty rozpadłych komórek, określa się terminem **fagocytozy**. W procesie tym bardzo aktywne są neutrofile i komórki układu makrofagów, ale fagocytują również inne komórki. Fagocytoza odbywa się przez otoczenie wypustkami cząstki uprzednio zaadsorbowanej na powierzchni komórki. Do powstałej wakuoli o średnicy kilkuset nm, zawierającej pobraną cząstkę wewnątrz komórki, szybko dołączają lizosomy, tworząc fagolizosomy.

Pinocytoza jest to włączanie do komórki substancji rozpuszczonych w płynie otaczającym komórkę. Pęcherzyki pinocytarne powstają podobnie jak wakuole podczas fagocytozy i zwykle mają średnicę 150–250 nm. W wielu komórkach, np. komórkach śródbłonka i miocytach gładkich, obserwuje się **transport tranzytowy**. Pojawiające się w tych komórkach pęcherzyki o średnicy 65–120 nm przenoszą substancje (rozpuszczalne) z jednej powierzchni komórki na drugą bez wykorzystania zawartości do własnych potrzeb.

W wielu komórkach obserwuje się liczne, regularne wgłębienia błony komórkowej o średnicy 50–100 nm, które nazwano kaweolami (ryc. 6.16). **Kaweole** są jedną z form tratw lipidowych. Ich występowanie zależy od białek: kaweolin i kawin, a także od zawartości cholesterolu w błonie. Jak wspomniano, tratwy lipidowe zawierają dużo cholesterolu i sfingolipidów oraz stanowią struktury słabo rozpuszczalne w takich detergentach, jak Triton X-100 w 4°C. Umożliwia to ich izolowanie i badanie wraz z zawartymi tam białkami. Składnikami struktury kaweoli są charakterytyczne białka nazywane kaweolinami. Wyróżnia się ich izoformy **kaweoliny-1,-2,-3** obecne w różnych komórkach. **Kaweolina-3** występuje w komórkach mięśni szkieletowych, sercowych, gładkich, podczas gdy **kaweolina-1** głównie w komórkach tłuszczowych, fibroblastach, komórkach nabłonkowych i śródbłonka. Kaweoliny są wiążącymi cholesterol integralnymi białkami błony o kształcie spinki do włosów, co umożliwa skierowanie ich N- i C-końca do cytoplazmy (ryc. 6.7, ryc. 6.9). W obrębie białka kaweoliny można wyróżnić hydrofobową domenę kotwiczącą ją w błonie, domenę oligomeryzacji z innymi cząsteczkami oraz domenę stanowiącą rusztowanie.

Kaweole i ich białka kaweoliny biorą udział w wielu funkcjach komórki, w transporcie tranzytowym, ale też w utrzymywaniu równowagi cholesterolu i, co ważne, **w przekazywaniu sygnałów komórce**. W kaweolach identyfikowano receptory wiążące białka-G, receptory kinaz tyrozynowych, białka rodziny kinaz tyrozynowych Src, białka kaskady Ras MAPK oraz syntazy tlenku azotu. Białka te w kaweolach bezpośrednio mogą oddziaływać z domeną rusztowania kaweoliny-1 albo -3, zależnie od typu komórki. Często oddziaływanie takie stanowi przytrzymanie cząsteczki receptora do czasu dotarcia tam sygnału lub oddziaływanie takie powoduje wzmocnienie sygnału. Kaweole biorą więc udział w regulowaniu procesów metabolizmu komórkowego oraz stanowią o lokalizacji tych zdarzeń w określonych okolicach błony komórkowej.

Niektóre receptory pobrane drogą endocytozy, np. nabłonkowego czynnika wzrostu (EGF-R), są depolimeryzowane w lizosomach razem z czynnikiem wzrostowym, inne, np. receptor insuliny i LDL, częściowo powracają na powierzchnię komórki, jeszcze inne, np. α_2-makroglobulina, powracają prawie wszystkie na powierzchnię komórki. Niektóre ligandy, np. lektyna konkanawalina A, wiązana przez reszty D-mannozowe wielocukrów w glikoproteinach na powierzchni komórki, powodują nasiloną endocytozę, a zawierające lektynę wakuole długo pozostają w komórce. Prowadzi to do zablokowania **krążenia błon** oraz powoduje wzmożoną biogenezę błon w komórce.

KLINIKA

W kaweolach adipocytów są liczne **receptory insuliny** (ryc. 6.16). Traktowanie komórek *in vitro* insuliną powodowało gromadzenie w kaweolach **transportera glukozy GLUT4**. Stanowi to sugestię o związku kaweoli oraz zawartych tam kaweolin z regulacją metabolizmu energetycznego komórki z udziałem sygnalizacji insuliny. Insulina wywołuje różne biologiczne odpowiedzi, których część można zaliczyć do kategorii odpowiedzi metabolicznych, a część do odpowiedzi proliferacyjnych. Związanie insuliny z receptorem (IR) aktywuje odpowiedź metaboliczną przez fosforylację tyrozyny receptora, który wtedy przyciąga i wiąże substrat receptora insuliny (IRS), a ten fosforylowany aktywuje kinazę PI3, powodującą przemieszczanie GLUT4 do błony komórkowej, co zwiększa pobieranie glukozy do komórki. Tam transporter glukozy GLUT4 jest przytrzymywany kaweoliną-1.

Oporność wielolekowa

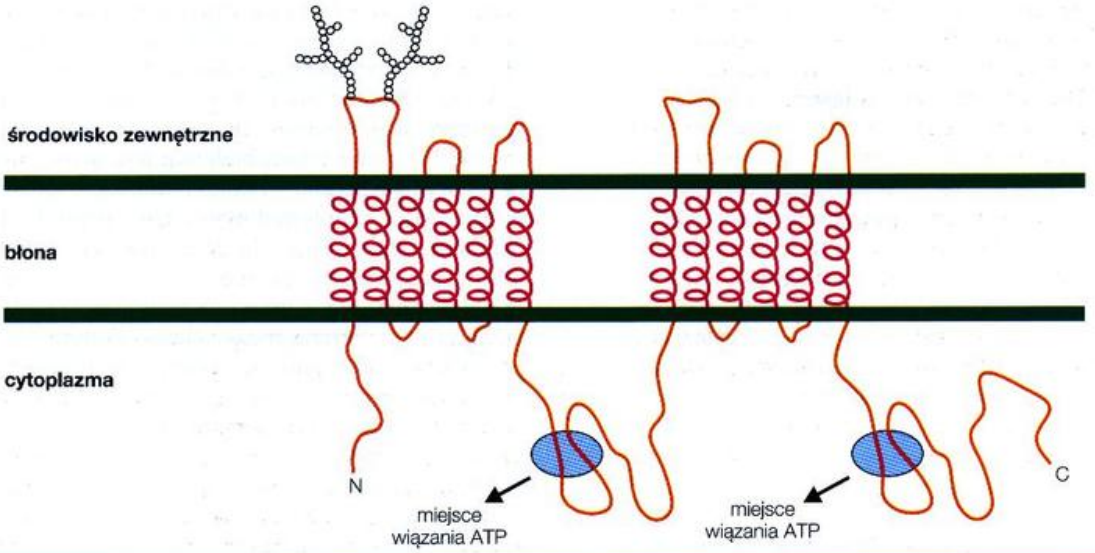
KLINIKA

Lekarzom dobrze jest znane zjawisko oporności wielolekowej (**MDR** – ang. *multidrug resistance*), czyli oporności komórek mało swoistej, na działanie antybiotyków i cytostatyków. Jest ono przyczyną wielu niepowodzeń w leczeniu schorzeń bakteryjnych i nowotworowych. Oporność ta wynika z obecności w błonie komórkowej kilku białek, z których najlepiej poznane to P-glikoproteina oraz białko **MRP** (ang. *multidrug resistance protein*).

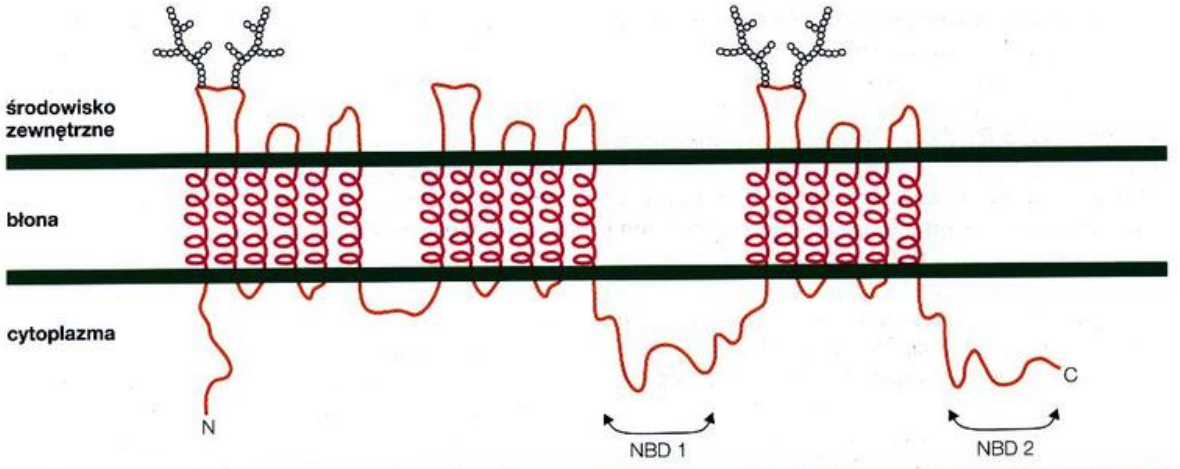
Układ MDR chroni komórkę przed różnymi substancjami toksycznymi o charakterze lipofilnych kationów. W tym samym układzie komórka broni się przed lekami. Ponieważ usuwanie z komórek leków celowo podawanych choremu czyni patologicznie zmienione komórki mało podatnymi na leczenie, zjawisko w tym przypadku jest niekorzystne.

P-glikoproteina jest integralnym białkiem błonowym, fosfoglikoproteiną o masie 170 kD (ryc. 6.24). Białko działa jak pompa zależna od ATP, transportująca toksyny na zewnątrz komórki. Wiele komórek nowotworowych wykazuje nadmierną ekspresję tego białka, a pompa jest w nich bardzo aktywna, co utrudnia chemioterapię nowotworów. W łańcuchu polipeptydowym P-glikoproteiny jest podwójny zespół 6 α-helis przecinających dwuwarstwę lipidową błony, a w cytoplazmie są dwa miejsca wiążące ATP, tzw. motyw ABC (ang. *ATP-Binding Cassette*). W P-glikoproteinie podstawowa struktura łańcucha polipeptydowego jest podwojona.

Białko MRP ma masę cząsteczkową 190 kD i tworzą je trzy zespoły po 6 α-helis (ryc. 6.25). Białko w błonie komórkowej jest stosunkowo stabilne, czas połowiczny „życia "białka wynosi około 20 godzin. Duży procent zsyntetyzowanego białka jest jednak degradowany stosunkowo szybko już w sia-



Rycina 6.24 Model transportera leków (toksyn) w komórkach człowieka, P – glikoproteina. W kółkach miejsca wiążące ATP (motywy ABC), łańcuchy cukrowcowe od strony środowiska są zaznaczone łańcuchami kółek.



Rycina 6.25 Budowa MRP. Jak inni przedstawiciele rodziny białek ABC, każda połowa MRP składa się z wielu α-helis przechodzących przez błonę komórkową.

teczce śródplazmatycznej. Białko MRP znajdujące się w siateczce śródplazmatycznej i aparacie Golgiego prawdopodobnie jest magazynem, z którego w razie potrzeby białko to może szybko zostać przeniesione do błony komórkowej. Nadekspresja tego białka pojawia się wcześnie w komórkach nowotworowych, nawet przy niskim stężeniu leku.

Oporność wielolekowa jest głównym problemem w chemioterapii nowotworów. W większości nowotworów z przerzutami chemioterapeutyki stosuje się celem przedłużenia życia chorego bądź paliatywnie. Wiele nowotworów, jak: rak sutka, jajnika, chłoniaki nie-Hodgkina, białaczki u dorosłych, początkowo dobrze odpowiada na chemioterapię, potem stają się one jednak oporne na te leki. Dlatego są prowadzone intensywne badania nad lekami wybiórczo kierowanymi do komórek nowotworowych, by stężenie leku było w nich wielokrotnie wyższe niż w komórkach prawidłowych. Takie leki przypuszczalnie nie będą prowadzić do oporności wielolekowej, gdyż zaraz w pierwszym okresie leczenia doprowadzą do zniszczenia komórek nowotworowych. Inne nowotwory, jak: niedrobnokomórkowy rak płuca, rak jelita grubego, żołądka, nerki, trzustki, od początku są jednak oporne na chemiczne leczenie.

Zjawisko fuzji błon

Fuzja błon biologicznych jest powszechnie występującym procesem w komórkach, np. podczas endocytozy, wydzielania, krążenia składników błon wewnątrz komórki. Fuzja błon komórkowych przebiega np. podczas łączenia się komórki jajowej z plemnikiem oraz łączenia się mioblastów w czasie miogenezy. Zachodzi też w procesach patologicznych, np. podczas tworzenia się komórek wielojądrzastych w odpowiedzi zapalnej, a także podczas wnikania do komórki niektórych wirusów.

Fuzja jest zjawiskiem, w którym dwuwarstwa lipidowa błony komórki łączy się z dwuwarstwą innej komórki albo sztucznego pęcherzyka otoczonego dwuwarstwą lipidową. W ten sposób również zawartość obu, dotąd oddzielnych, zamkniętych błonami przestrzeni łączy się. Integralne białka błonowe na skutek dyfuzji bocznej mieszają się we wspólnej błonie nowo powstałego w ten sposób tworu.

Wiele wirusów ma w otoczce białka, od których zależy wnikanie wirusa do komórki. Na przykład w wirusie grypy takim białkiem jest hemaglutynina, w wirusie Sendai – białko F. Białka te zawierają w łańcuchu polipeptydowym tzw. peptydy fuzji – domeny zbudowane z 16–26 aminokwasów hydrofobowych, które mogą tworzyć strukturę α-helisy. Powierzchnia zewnętrzna α-helisy jest hydrofobowa, a wewnętrzna może wiązać protony. Wirus początkowo jest zatrzymywany na powierzchni komórki, a potem jest endocytowany. W niskim pH endosomu domeny α-helis wiążą H^+ i agregują, co prowadzi w tych miejscach do fuzji błony endosomu i otoczki wirusa, którego zawartość jest wtedy uwalniana do cytoplazmy zakażonej komórki (ryc. 6.1).

Białka zawierające peptydy fuzji są wykorzystywane do celowego łączenia komórek. Jeżeli są to komórki o różnym genomie, można otrzymać

hybrydy mające różne jądra komórkowe – **heterokariony**. Służą one do ustalenia w eksperymentach laboratoryjnych, jak zachowują się komórki mające dwa różne genomy, czasem niekompletne, np. do wyjaśnienia skutków braku funkcji określonego genu.

Otrzymywanie heterokarionów, hybryd komórkowych, wykorzystuje się również do uzyskiwania przeciwciał monoklonalnych. Przeciwciała monoklonalne można wykorzystywać do celów diagnostycznych oraz leczniczych. Ważne jest, aby mieć takiego przeciwciała dużo i aby wiązało się ono stale z tę samą okolicą, epitopem badanego białka.

Limfocyt B, zdolny do wytworzenia określonego przeciwciała po pobudzeniu, dzieli się i powstaje z niego po kilku podziałach mały klon komórek wytwarzających identyczne przeciwciało nazywane **monoklonalnym**, bo produkowanym przez jeden klon komórek mających identyczne geny kodujące łańcuchy immunoglobuliny. Chcąc otrzymać duży klon określonego limfocytu B, należy zmienić limfocyt w komórkę nowotworową, dzielącą się bez ograniczeń. Można to zrobić przez fuzję limfocytu B z komórką nowotworową, szpiczakiem, i tak otrzymać komórkę **hybrydoma**, wytwarzającą immunoglobuliny monoklonalne w dużej ilości. Takie monoklonalne przeciwciało, np. anty-CD20, stosuje się w leczeniu niektórych chłoniaków i białaczek B-komórkowych.

Piśmiennictwo

Fedoryszak-Kuska N, Panasiewicz M, Pacuszka T. *Tratwy lipidowe – obserwacje i wątpliwości.* Post. Biol. Kom. 2011, 38, 313–332.

Hejnowicz Z.: *Akwaporynowe kanały wodne komórek zwierzęcych i roślinnych.* Post. Biol. Kom. 1996, 23, 529–546.

Hinek A.: *Endocytoza adsorpcyjna i receptosomy.* Post. Biol. Kom. 1983, 10, 23–42.

Michałek K.: *Rola akwaporyny 2 w nerkowej resorpcji wody u noworodków.* Post. Biol. Kom. 2010; 37 (4), 835.

Muła A., Nowis D.: *Różnorodność świata transporterów glukozy.* Post. Biol. Kom. 2011; 38 (4), 559–580.

Roszek K., Gniot-Szulżycka J.: *Wielorakie formy pęcherzyków opłaszczonych klatryną w zależnym od receptorów transporcie i segregacji makromolekuł.* Post. Biol. Kom. 2000, 27, 295–314.

Szablewski L.: *Ułatwiona dyfuzja glukozy w komórkach ssaczych. I. Budowa, mechanizm działania i lokalizacja GLUT.* Post. Biol. Kom. 1998, 25, 633–648.

Szablewski L.: *Rola białek GLUT w dyfuzji glukozy do komórek ssaczych. II. Wpływ insuliny na aktywność GLUT 1 i GLUT 4.* Post. Biol. Kom. 1999, 26, 387–399.

ROZDZIAŁ 7

Cytoszkielet

Maciej Zabel, *Janusz Kubrakiewicz*

HASŁA

Cytoszkielet

Zespół wewnątrzkomórkowych włókienek białkowych, decydujący o kształcie komórki i jej wewnętrznej organizacji, jest zaangażowany w transport i rozmieszczenie organelli komórkowych oraz ruch i skurcz komórki. Do cytoszkieletu zalicza się: mikrotubule, mikrofilamenty i filamenty pośrednie.

Mikrotubule

Białkowe rurki o średnicy ok. 25 nm powstające w wyniku polimeryzacji heterodimerów zbudowanych z α i β tubuliny. Polimeryzacja i depolimeryzacja podjednostek tubulinowych przyczynia się do zmian długości mikrotubul. Miejscem inicjalnego formowania się mikrotubul są centra nukleacji zawierające γ tubulinę (np. w centrosomie). Obecność cytoszkieletu mikrotubularnego umożliwia ukierunkowany ruch wewnątrzkomórkowy oraz warunkuje utrzymanie kształtów komórki. Stabilne układy mikrotubul są elementami szkieletowymi i ruchowymi rzęsek i wici.

MAP (białka towarzyszące mikrotubulom)

Grupa białek łączących się z mikrotubulami, wpływająca na ich stabilizację oraz funkcje.

Wrzeciono kariokinetyczne

Zorganizowany system mikrotubul powstający i funkcjonujący w czasie podziału komórki. Mikrotubule wrzeciona biorą czynny udział m.in. w ruchu chromatyd/chromosomów w czasie anafazy oraz w wyznaczaniu płaszczyzny podziału komórkowego.

Rzęski i witki

Trwałe wypustki komórkowe o niewielkiej średnicy, których szkielet wewnętrzny tworzy aksonema – zorganizowany zespół stabilnych mikrotubul. Obecność związanych z aksonemą białek motorycznych (dyneiny aksonemalnej) umożliwia aktywny ruch rzęsek i wici.

Filamenty pośrednie

Włókienka cytoszkieletu o średnicy ok. 10 nm zbudowane z różnych białek, swoistych dla poszczególnych typów tkanek. Filamenty pośrednie charakteryzują się dużą wytrzymałością na stresy mechaniczne i działanie substancji chemicznych. Tworzą sieci mechanicznie stabilizujące komórki i tkanki. W komórkach nabłonkowych biorą udział w tworzeniu połączeń międzykomórkowych (desmosomów i hemidesmosomów), w tkance mięśniowej stabilizują strukturę miofibrylli, a w neuronach wypustki.

Mikrofilamenty (filamenty aktynowe)

Polimery zbudowane z cząsteczek aktyny. Mikrofilamenty łączą się w pęczki lub sieci, które nadają komórkom kształt i wytrzymałość, tworzą elementy szkieletowe stabilnych struktur komórkowych (mikrokosmków), są ważnym elementem kory komórkowej i połączeń międzykomórkowych (obwódek zwierających i przyczepów ogniskowych). Tworzą struktury mniej stabilne związane z ruchem komórki (lamelipodia i filopodia), przyleganiem komórek do podłoża (włókienka naprężeniowe) i z cytokinezą (pierścień kurczliwy). W tkance mięśniowej występują w postaci miofilamentów cienkich, które wraz z filamentami grubymi przyczyniają się do skurczu mięśnia.

Białka wiążące aktynę (ABP)

Duża grupa białek wiążąca się z aktyną monomeryczną (aktyną G) bądź spolimeryzowaną (aktyna F, mikrofilamenty). ABP umożliwiają tworzenie pęczków i sieci mikrofilamentów, wpływają na ich stabilizację oraz przyczepienie się do organelli i błony komórkowej. Najważniejsze ABP to α-aktynina i miozyna.

Białka motoryczne

Białka, które dzięki zdolności do hydrolizy ATP mogą aktywnie poruszać się wzdłuż mikrotubul i filamentów aktynowych. Białka motoryczne związane z mikrotubulami (**dyneina, kinezyna**) są zaangażowane w ukierunkowany transport organelli komórkowych, ruch chromosomów w czasie podziału komórki oraz ruch rzęsek i witek. Grupę białek motorycznych wiążących aktynę tworzą miozyny. Miozyna I umożliwia transport organelli wzdłuż filamentów aktynowych, podczas gdy miozyna II wchodzi w skład aparatu kurczliwego mięśni. W mięśniach poprzecznie prążkowanych miozyna II tworzy miofilamenty grube wsuwające się między miofilamenty cienkie, co prowadzi do skurczu mięśnia. Miozyna II umożliwia również przemieszczanie się komórek niemięśniowych oraz bierze udział w cytokinezie.

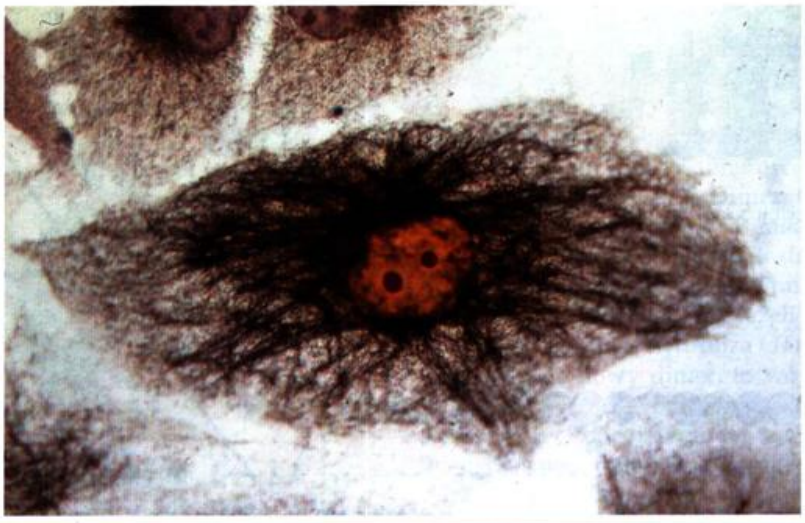
Kora komórki

Zewnętrzna strefa komórki, utworzona przez krótkie filamenty aktynowe i spektrynowe oraz liczne białka łączące je z błoną komórkową. Struktura ta nadaje kształt komórkom, zwiększa ich wytrzymałość oraz uczestniczy w transporcie pęcherzykowym.

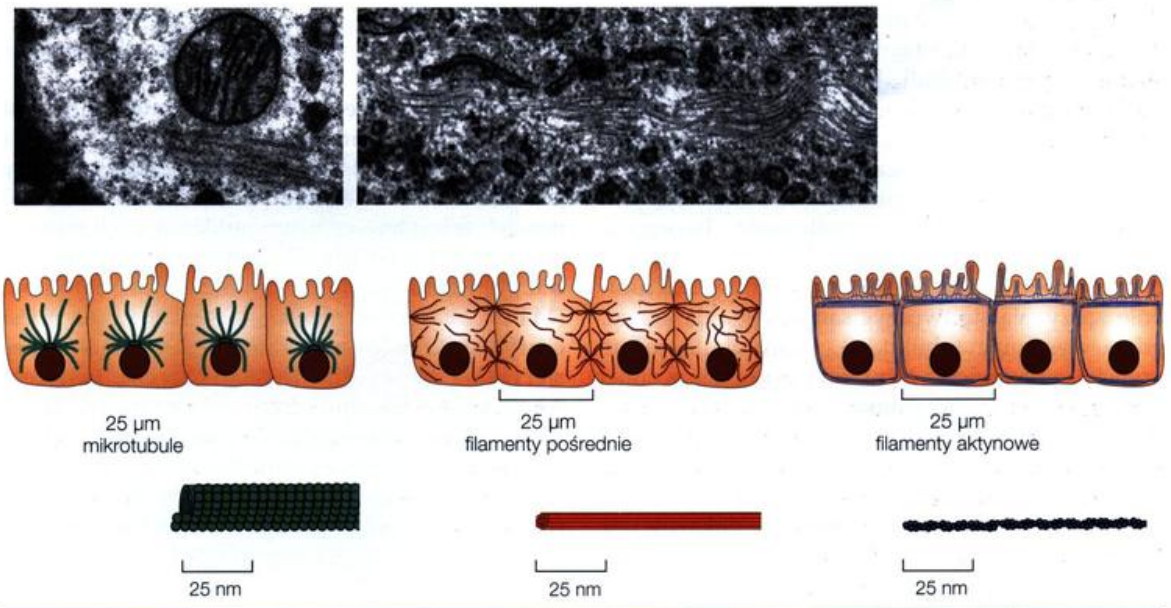
Cytoszkielet jest złożonym systemem wewnątrzkomórkowych włókienek białkowych charakterystycznym dla organizmów eukariotycznych. Różny skład molekularny poszczególnych typów włókienek, ich rozmiary oraz odmienna organizacja przestrzenna, pozwalają na wyróżnienie trzech klas elementów cytoszkieletu. Należą do nich: mikrotubule, mikrofilamenty oraz filamenty pośrednie. Cytoszkielet jest wewnętrznym „rusztowaniem" komórki (ryc. 7.1, 7.2): warunkuje jej kształt i organizację, umożliwia skurcz, zmianę kształtu i ruch komórki oraz jej podziały, uczestniczy w wewnątrzkomórkowym transporcie organelli i makromolekuł. Elementy cytoszkieletu wchodzą w bezpośredni kontakt z połączeniami międzykomórkowymi, wpływając na utrzymanie integralności tkanki, ruchy morfogenetyczne zespołów komórkowych itp. Niektóre składniki cytoszkieletu zachowują stabilność, wchodząc w skład trwałych elementów komórki, np.: centrioli, rzęsek, wici, miofibryli, mikrokosmków i wypustek komórkowych. Pozostałe tworzą dynamicznie zmieniający się układ włókien zaangażowanych w: ruch komórki jako całości, tworzenie i zmiany jej kształtów oraz reorganizację wewnętrzną. Współdziałające ze sobą poszczególne składniki cytoszkieletu wraz z dużą i różnorodną pod względem struktury i funkcji grupą białek towarzyszących tworzą zintegrowany system wewnątrzkomórkowy warunkujący prawidłowe funkcjonowanie wszystkich typów komórek eukariotycznych.

Mikrotubule

Mikrotubule są długimi rurkami o średnicy 25 nm i kanale wewnętrznym o średnicy 15 nm. Mogą występować w cytoplazmie pojedynczo lub tworzyć bardziej złożone układy, jak np. wrzeciono kariokinetyczne lub rzęski. Mikrotubule są zbudowane z podjednostek zwanych **tubuliną**, a ich stabilność i wiele właściwości zależy od białek dodatkowych, zwanych białkami towarzyszącymi mikrotubulom (**MAP**).



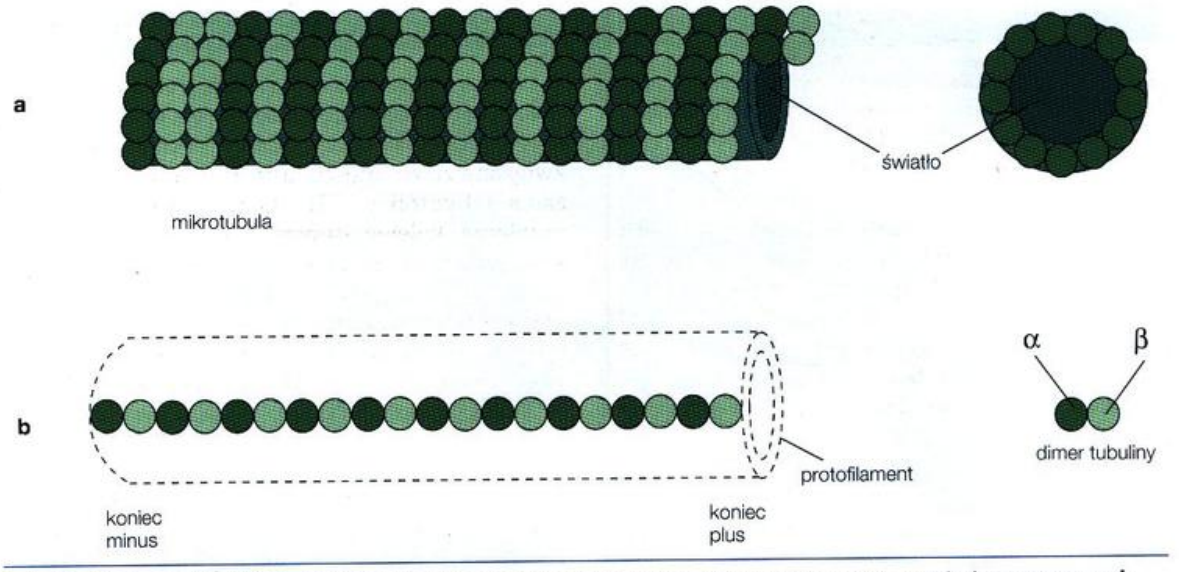
Rycina 7.1 Mikrotubule w komórce hodowanej *in vitro* wybarwione immunocytochemicznie za pomocą specyficznych przeciwciał i znakowania solami srebra.



Rycina 7.2 Mikrofotografie pokazują obraz elektronowo-mikroskopowy mikrotubul (*po lewej*) i filamentów pośrednich (*po prawej*). Elektronogramy dzięki uprzejmości prof. Renaty Brelińskiej i dr Agnieszki Malińskiej. W dolnej części ryciny ogólna charakterystyka filamentów wchodzących w skład cytoszkieletu na przykładzie nabłonka jelita cienkiego (wg B. Alberts i wsp.).

Budowa i tworzenie się mikrotubul

Mikrotubule zbudowane są z białka – **tubuliny**. Każda cząsteczka tubuliny jest dimerem składającym się z dwóch globularnych białek, tubuliny α i tubuliny β (ryc. 7.3). Dimery tubuliny łączą się ze sobą i tworzą protofilamenty, w których cząsteczki są ułożone w sposób uporządkowany. Każdy protofilament ma budowę **spolaryzowaną** i na jednym z końców znajduje się tubulina α, a na drugim tubulina β. Umownie przyjmuje się, że mają **biegun minus** (tam, gdzie występuje tubulina α) i **biegun plus** (tam, gdzie występuje tubulina β). 13 protofila-



Rycina 7.3 Budowa mikrotubuli: **a.** rozmieszczenie cząsteczek tubuliny w mikrotubuli w widoku z boku i w przekroju poprzecznym; **b.** cząsteczka tubuliny, czyli dimeru, oraz ich zorganizowane ułożenie w protofilamencie wywołujące polarność mikrotubuli (b) (wg B. Alberts i wsp.).

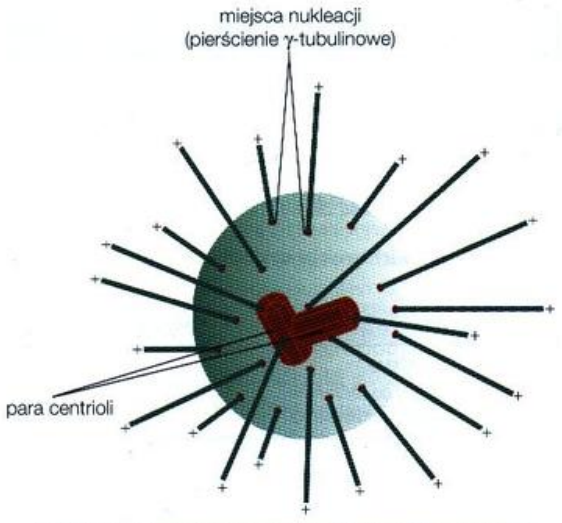
mentów łączy się dalej bok do boku i tworzy układ rureczki – mikrotubuli. W rzeczywistości w komórce nie powstają jednak poszczególne protofilamenty łączące się ze sobą, ale tworzą się pierścienie zbudowane z 13 cząsteczek tubuliny i wszystkie protofilamenty jednej mikrotubuli wzrastają jednocześnie, powodując jej wydłużenie. Tworzenie mikrotubul można zaobserwować w warunkach *in vitro*. W roztworach cząsteczek tubuliny mikrotubule zaczynają się tworzyć samoistnie. Na końcu, gdzie występuje tubulina β, mikrotubula rośnie szybciej, a na końcu z tubuliną α wyraźnie wolniej i dlatego końce te nazwano odpowiednio biegunem plus i minus. Dodanie pewnych substancji może stabilizować mikrotubule i przyspieszać ich wzrost lub uniemożliwiać ich polimeryzację, powodując rozpad (tab. 7.1). Doświadczenia te pokazują, że mikrotubule są strukturami dynamicznymi, tzn. mogą się rozpadać, skracać i wydłużać lub tworzyć na nowo.

W komórce proces **powstawania mikrotubul** jest podobny jak w warunkach *in vitro*, ale występują jednak istotne różnice. W komórce stężenie tubuliny jest stosunkowo małe i do powstania mikrotubuli potrzebne jest tzw. centrum nukleacji, czyli miejsce, od którego rozpoczyna się polimeryzacja mikrotubul. Najważniejszym centrum nukleacji mikrotubul (**MTOC** – ang. *microtubules organizing center*) jest centrosom zbudowany z niewielkiej amorficznej, sferycznej macierzy zawierającej zwykle parę centrioli. Na powierzchni centrosomu cząsteczki tubuliny γ tworzą pierścienie, do których przyczepiają się dimery tubuliny w ten sposób, że z tubuliną γ łączy się zawsze tubulina α, czyli jej biegun minus (ryc. 7.4 i 7.5). Biegun wolny mikrotubuli jest więc biegunem plus, do którego mogą być dobudowy-

Tabela 7.1 Egzogenne substancje zmieniające stabilność mikrotubul

Mechanizm działania		
Blokowanie polimeryzacji mikrotubul	Tworzenie agregatów tubuliny zamiast mikrotubul	Stabilizacja mikrotubul
Kolchicyna[1] Kolcemid Nokodazol	winkrystyna winblastyna benomyl podofyliatoksyna	taksol (paclitaxel)

[1] Wyższe stężenia powodują depolimeryzację mikrotubul, a mniejsze blokują ich polimeryzację.



Rycina 7.4 Obraz centrosomu i polimeryzacji mikrotubul. Wewnątrz centrosomu znajduje sie para centrioli, powierzchnia centrosomu zawiera pierścienie γ-tubuliny, które są miejscem nukleacji dla mikrotubul; koniec minus mikrotubul jest zakotwiczony w pierścieniu γ-tubuliny, a koniec plus znajduje sie w cytoplazmie (wg B. Albert i wsp.).

Rycina 7.5 Skośny przekrój przez jeną z centrioli. Elektronogram dzięki uprzejmości prof. Renaty Brelińskiej i dr Agnieszki Malińskiej.

wane nowe dimery, powodując wzrost ich długości. W komórce na biegunie tym może dochodzić także do odłączania się cząsteczek tubuliny i mikrotubula może się skracać lub zanikać.

Dynamiczna niestabilność mikrotubul jest związana ze zdolnością dimerów tubuliny do wiązania i hydrolizy GTP. **Dimer tubuliny** z GTP przyłącza kolejne dimery i mikrotubula rośnie. W tym czasie dochodzi jednak do hydrolizy GTP do GDP w dimerach wewnątrz mikrotubuli, ale dimer końcowy zawiera GTP. Jeżeli jednak na końcu mikrotubuli nastąpi hydroliza GTP do GDP, zanim przyłączy się nowy dimer, to wówczas lawinowo odłączają się kolejne dimery i mikrotubula zaczyna się skracać. Końcowy dimer z GTP zabezpiecza więc czasowo mikrotubulę przed depolimeryzacją. Na dynamikę polimeryzacji i depolimeryzacji mikrotubul ma wpływ wiele różnych czynników zarówno endo-, jak i egzogennych.

KLINIKA

Niektóre białka wchodzące w skład białek towarzyszących mikrotubulom (zob. niżej) mają zdolność do wiązania się z mikrotubulami, co powoduje ich stabilizację, a co za tym idzie „utrwalenie" struktury mikrotubuli. Niektóre substancje należące do grupy naturalnych lub syntetycznych alkaloidów (np. kolchicyna, kolcemid, winblastyna, winkrystyna, taksol) wiążą się natomiast z tubuliną, przyczyniając się do depolimeryzacji lub stabilizacji cytoszkieletu mikrotubularnego (tab. 7.1). Substancje te mają duże znaczenie w medycynie praktycznej i są stosowane do dezorganizacji funkcjonowania wrzeciona kariokinetycznego i w efekcie hamowania podziałów komórkowych, co wykorzystywane jest głównie w leczeniu chorób nowotworowych.

Białka towarzyszące mikrotubulom

Jest to duża grupa białek łączących się z mikrotubulami. Wpływają na stabilność mikrotubul, łączenie się z innymi elementami cytoszkieletu i umożliwiają ruch wewnątrzkomórkowy (tab. 7.2). Do ważniejszych **MAP** (ang. *microtubule associated proteins)* zalicza się tzw. białka oczapkowujące, zabezpieczające końce mikrotubul przed depolimeryzacją. Białka te znajdują się w błonie organelli komórkowych i niektórych częściach błony komórkowej (ryc. 7.6). Uważa się, że z centrosomu stale wzrastają mikrotubule. Jeżeli mikrotubula nie dotrze do białka oczapkowującego na jakiejś strukturze komórkowej, to po pewnym czasie dochodzić musi do hydrolizy GTP na jej końcu, co powoduje, że mikrotubula

Tabela 7.2 Białka towarzyszące mikrotubulom – MAP

MAP są dużą grupą białek, które wiążą się z mikrotubulami, wpływając na ich polimeryzację, stabilizację lub nadając im określone funkcje. Poszczególne typy MAP są najczęściej swoiste dla poszczególnych tkanek i komórek.

Nazewnictwo MAP nie jest ostatecznie uporządkowane. Opiera się na różnych zasadach:

- nazewnictwo tradycyjne, np. białko tau, katenina, białka motoryczne: dyneina, kinezyna i dynamina, białka oczapkowujące,
- nazewnictwo numeryczne: MAP1, w tym MAP1A, MAP1B, MAP1C oraz MAP2, MAP3 i MAP4,
- nazewnictwo na podstawie ciężaru cząsteczkowego: HMW-MAP (*high molecular weight*) o ciężarze ponad 200 kD i LMW-MAP (*low molecular weight*) o ciężarze 20–60 kD.

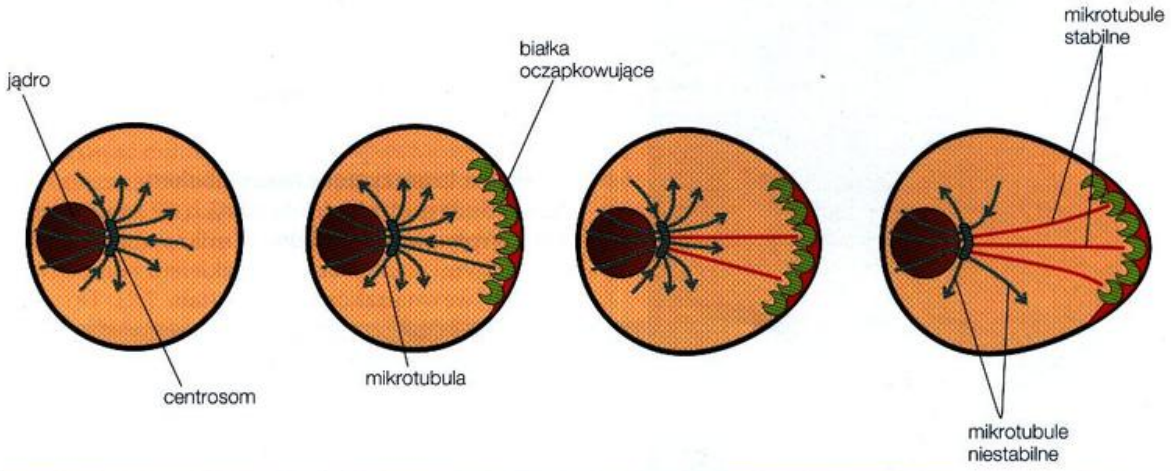
Zamieszanie powoduje pojawianie się w literaturze kilku synonimicznych nazw tego samego białka oraz równoległe stosowanie nazw opartych na różnych zasadach. Zestawy niektórych synonimów przedstawiono w tabeli.

Nazwa tradycyjna	Nazwa numeryczna	Nazwa przyjęta na podstawie ciężaru cząsteczkowego
Białka tau	MAP1B	LMW-MAP
Dyneina aksonemalna	MAP1C	należy do HMW-MAP
MAP stabilizujące dendryty	MAP2	należy do HMW-MAP

Stosuje się także czynnościowy podział MAP:

- MAP stabilizujące, łączące się z bocznymi powierzchniami mikrotubul w miejscu acetylacji lub fosforylacji tubuliny α, np. białka tau (w większości komórek, w aksonach), MAP2 (w dendrytach), kateniny (łączą mikrotubule z innymi elementami cytoszkieletu),
- MAP łączące koniec plus z innymi strukturami komórkowymi, co także stabilizuje mikrotubule, czyli białka oczapkowujące, np. z rodziny KAR,
- MAP umożliwiające ruch na mikrotubulach, czyli białka motoryczne: kinezyna, dyneina, dynamina, KAR3 i NCD.

zanika. W tym samym czasie powstaje w komórce wiele mikrotubul, ale pozostają tylko te, które zostaną zabezpieczone białkiem oczapkowującym, czyli te, które trafiły do miejsca swojego przeznaczenia. Procesy związane z tworzeniem mikrotubul i rozmieszczeniem białek stabilizujących są w komórce z pewnością ściśle kontrolowane. Mechanizmy będące podstawą tych procesów nie zostały jeszcze dobrze poznane. Kontrola stabilności mikrotubul jest bardziej złożona w komórkach dzielących się i w niektórych komórkach wysoce wyspecjalizowanych, np. komórkach nerwowych. Niezależnie od białek oczapkowujących, występują także inne białka MAP, które łączą boczne powierzchnie mikrotubul, umożliwiając tworzenie większych kompleksów (centriole, aksonemy rzęsek) lub łączenie z innymi elementami cytoszkieletu, co przyczynia się także do stabilizacji tych struktur. Pierwszym scharakteryzowanym MAP było białko tau, które łączy mikrotubule w pęczki. W chorobie Alzheime-



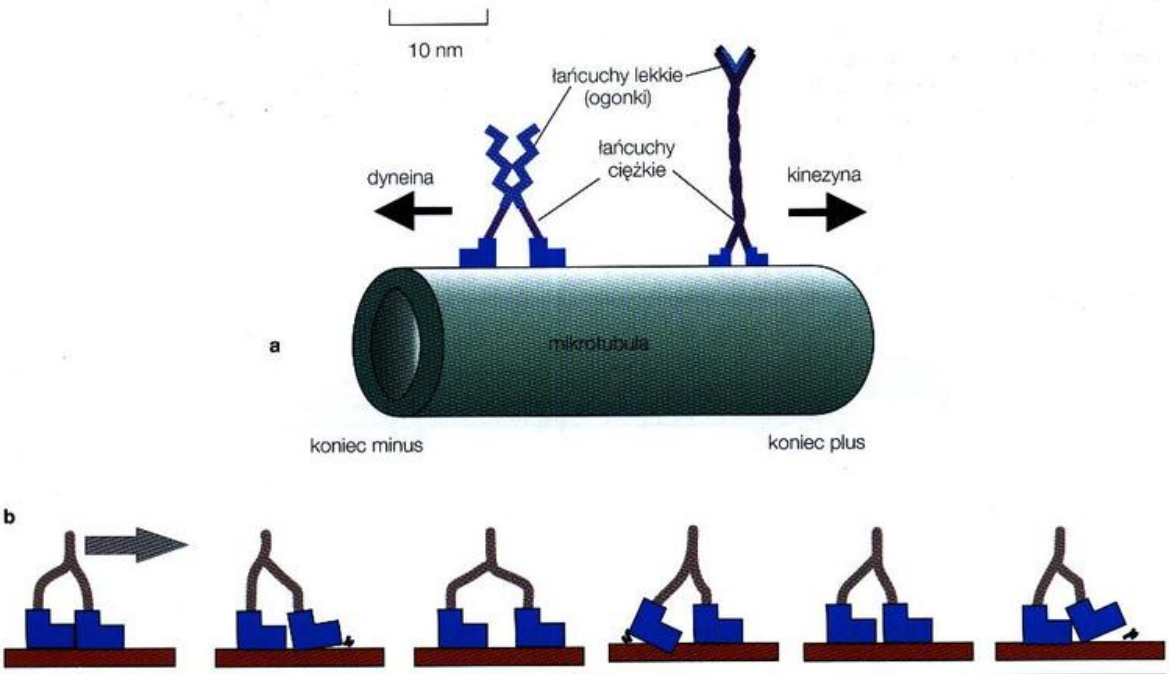
Rycina 7.6 Stabilizacja mikrotubuli występuje, gdy jej oba końce zostaną zabezpieczone przed depolimeryzacją. Koniec minus jest chroniony przez γ-tubulinę, a koniec plus może być chroniony przez białko oczapkowujące, np. w błonie komórkowej. Inne mikrotubule, których końce plus nie trafią na białko oczapkowujące, zostają zdepolimeryzowane. Jeżeli białka oczapkowujące będą znajdowały się na jednym z biegunów komórki, jak na tym schemacie, wówczas nastąpi przeorganizowanie wewnątrz komórki i komórka stanie się silnie spolaryzowana (wg B. Alberts i wsp.).

ra wykazano m.in. nieprawidłowy gen tego białka i syntezę tzw. dużego białka tau, które dezorganizuje układ mikrotubul i uniemożliwia prawidłowe funkcjonowanie neuronów.

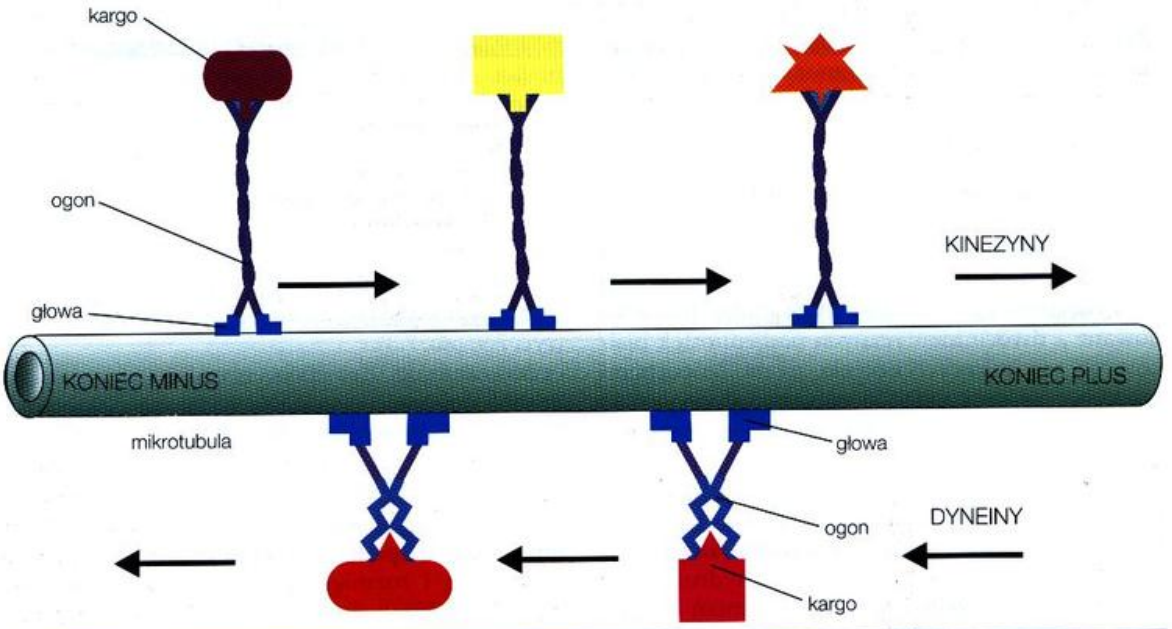
Białka motoryczne związane z mikrotubulami

Specjalnym rodzajem MAP są tzw. białka motoryczne umożliwiające transport wewnątrzkomórkowy. Zalicza się do nich dwie rodziny białek: **kinezyny** i **dyneiny**. Białka te budową swoją przypominają miozynę (ryc. 7.7). Każde z tych białek jest zbudowane z dwóch identycznych podjednostek białkowych zawierających odcinki zwane łańcuchami ciężkimi i lekkimi. Odcinki te tworzą dwie główki i jeden wspólny ogonek. Główki mogą łączyć się z podjednostkami tubuliny, a ogonki łączą się z innymi strukturami komórkowymi, np. organellami komórkowymi lub makrocząsteczkami (białkami lub mRNA). Główki białek motorycznych wykazują ponadto aktywność ATP-azy i mogą hydrolizować ATP, w wyniku czego dochodzi do zmian konformacji główek i odłączania się główki od tubuliny. Hydroliza ATP w obu główkach tej samej cząsteczki zachodzi naprzemiennie, co umożliwia „kroczenie", czyli przesuwanie się białek motorycznych po tubulinie. Kierunek kroczenia zależy od rodzaju białka motorycznego. Kinezyna przemieszcza się od bieguna minus do bieguna plus, a dyneina odwrotnie. Wraz z białkami motorycznymi są przemieszczane dołączone do nich organelle komórkowe (ryc. 7.8). Transport taki jest stosunkowo szybki, do kilkudziesięciu centymetrów na dobę i jest znacznie szybszy od zwykłej dyfuzji. Najlepszym przykładem obrazującym różne kierunki transportu i ich szybkość może być transport aksonalny (ryc. 7.9, tab. 7.3).

Mikrotubule decydują również o **rozmieszczeniu organelli** komórkowych we wszystkich komórkach. W warunkach prawidłowych siateczka śródplazmatyczna i aparat Golgiego mają charakterystyczne położenie. Aparat Golgiego jest zwartą strukturą znajdującą się w pobliżu jądra komórkowego, a siateczka śródplazmatyczna jest strukturą luźną i rozmieszczoną w całej cytoplazmie (ryc. 7.10). Jeżeli do komórki wprowadzi się kolchicynę, powodującą w dużych stężeniach depolimeryzację mikrotubul, to organelle te całkowicie zmieniają swój wygląd. Siateczka śródplazmatycz-

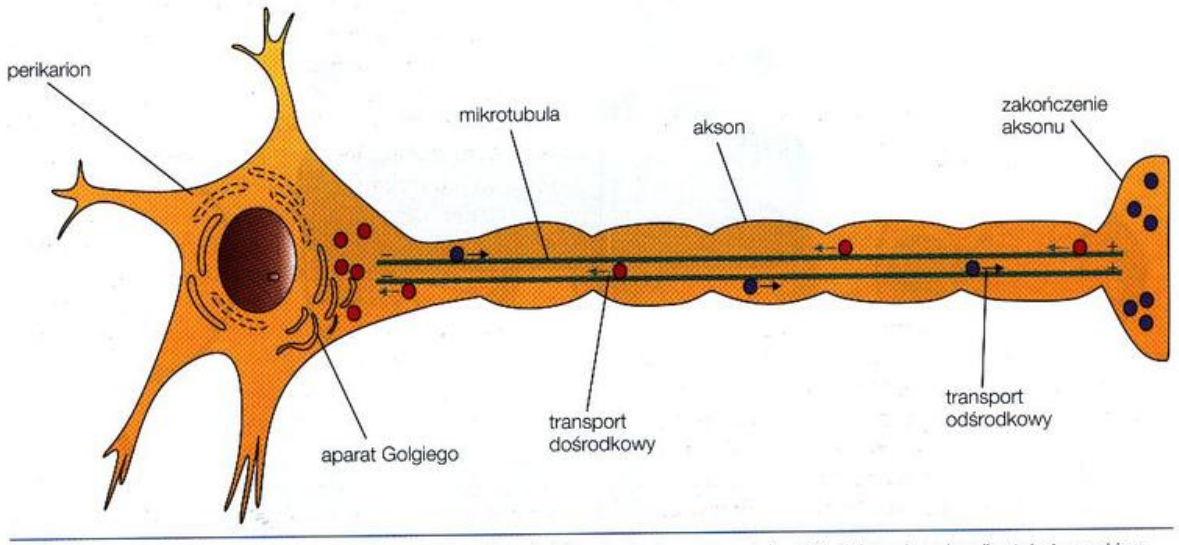


Rycina 7.7 Białka motoryczne mikrotubul: **a.** budowa kinezyny i dyneiny cytoplazmatycznej i kierunek ich przemieszczania po mikrotubuli. Główki obu białek motorycznych kroczą po mikrotubuli, podobnie jak główki miozyny po aktynie. Dyneina przemieszcza się do końca minus, a kinezyna do końca plus. Ogonki obu białek mogą łączyć się z transportowaną organellą lub makrocząsteczką; **b.** zależne od ATP kroczenie białek motorycznych po mikrotubuli (wg B. Alberts i wsp.).



Rycina 7.8 Białka motoryczne transportują wzdłuż mikrotubul różne obłonione organelle lub makrocząsteczki (kargo). Rodzaj białka motorycznego decyduje o kierunku transportu, a budowa ogonka o rodzaju transportowanej organelli (wg B. Alberts i wsp.).

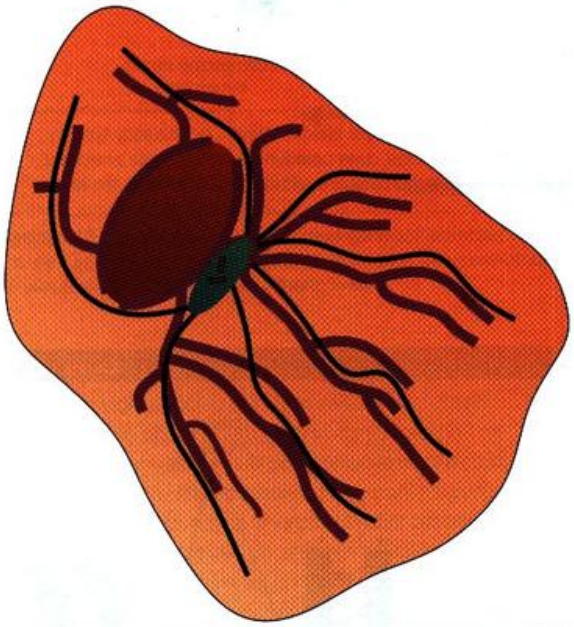
na skupia się w środku komórki, a aparat Golgiego rozpada się na drobne pęcherzyki rozproszone w całej cytoplazmie. Prawidłowe rozmieszczenie tych organelli jest związane z obecnością w ich błonie białek receptorowych dla białek motorycznych. Aparat Golgiego wiąże się z dyneiną, która przyciąga jego elementy do środka komórki, a siateczka śródplazmatyczna wiąże się z kinezyną, która rozciąga ją po całej cytoplazmie.



Rycina 7.9 W neuronach akson może mieć długość od kilku do kilkudziesięciu centymetrów. W każdym aksonie mikrotubule są skierowane w tę samą stronę (biegun plus do synapsy), co umożliwia szybki ukierunkowany transport organelli obłonionych, np. pęcherzyków synaptycznych i mitochondriów odśrodkowo do kolbki synaptycznej (transport postępowy za pomocą kinezyn) i zużytych organelli do perikarionu (transport wsteczny za pomocą dynein) (wg B. Alberts i wsp.).

Tabela 7.3 Rodzaje i podstawowa charakterystyka transportu aksonalnego. Transport szybki zależy od mikrotubul i białek motorycznych, a wolny od dyfuzji

Rodzaj transportu	Szybkość transportu (mm/dzień)	Rodzaj transportowanych składników
Transport szybki		organelle obłonione
postępowy (anterogradowy)	200–400	struktury pęcherzykowe, np. pęcherzyki synaptyczne wraz z neuroprzekaźnikami
wsteczny (retrogradowy)	100–200	pęcherzyki endocytarne i pęcherzyki z recyrkulującymi neuroprzekaźnikami i białkami
mitochondriów	50–100	mitochondria
Transport wolny		składniki cytoszkieletu i cytoplazmy
składniki a	0,1–1,0	składniki neurofilamentów, mikrotubul i białka towarzyszące
składniki b	2–6	aktyna, klatryna, spektryna, enzymy cytoplazmatyczne

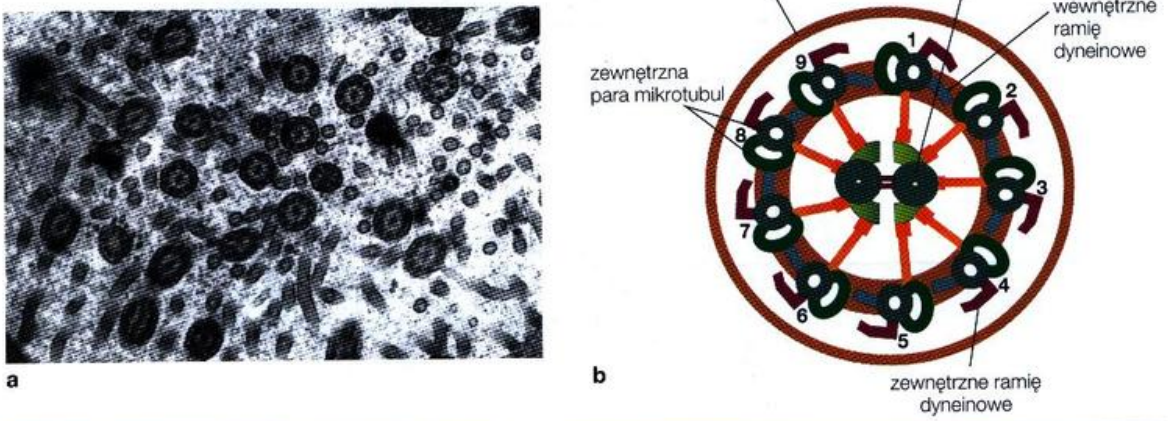


Rycina 7.10 Udział mikrotubul wrozmieszczeniu organelli w cytoplazmie. Mikrotubule (*czarne*) i siateczka śródplazmatyczna (*fioletowy*) (wg B. Alberts i wsp.).

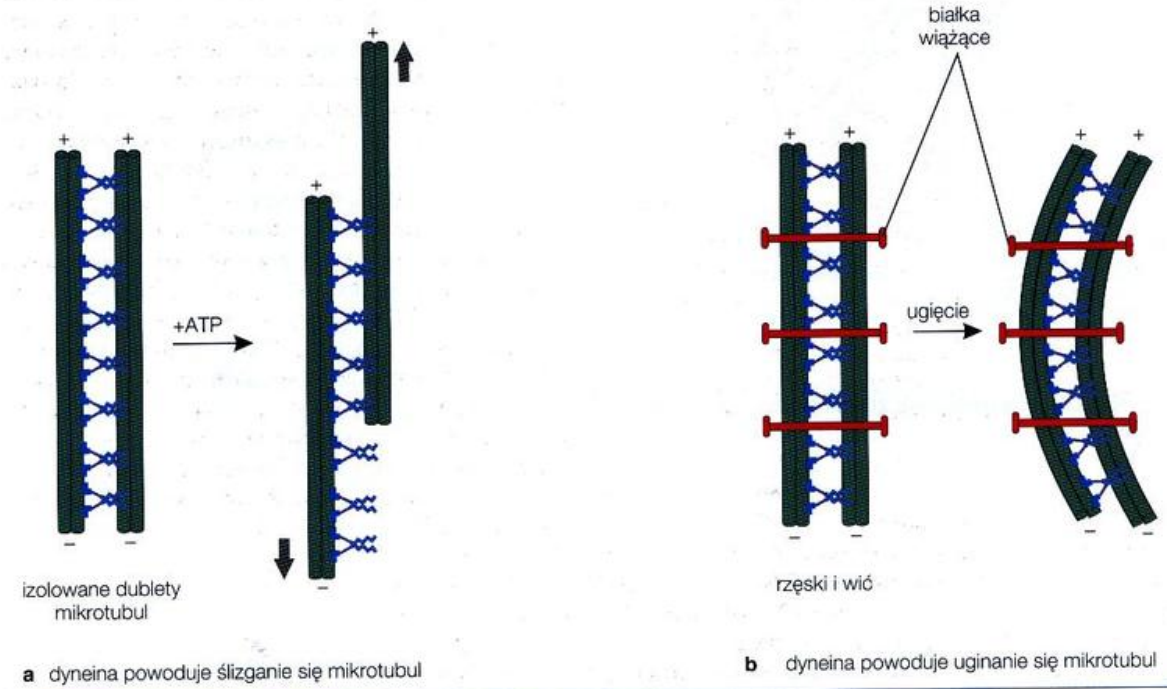
Struktury komórkowe zbudowane z mikrotubul

Mikrotubule w komórce tworzą dwie zasadnicze frakcje. Frakcja mikrotubul **labilnych** podlega ciągłej, dynamicznej przebudowie, jednocześnie polimeryzuje i depolimeryzuje. Mikrotubule labilne skracają się i wydłużają, zmieniając swe położenie w cytoplazmie. Pozostałe mikrotubule tworzą w komórce elementy **trwałe**, które znacznie wolniej bądź wcale się nie zmieniają się. Mocno stabilizowane mikrotubule tworzą specjalne struktury komórkowe, takie jak: centriole oraz rzęski i witki.

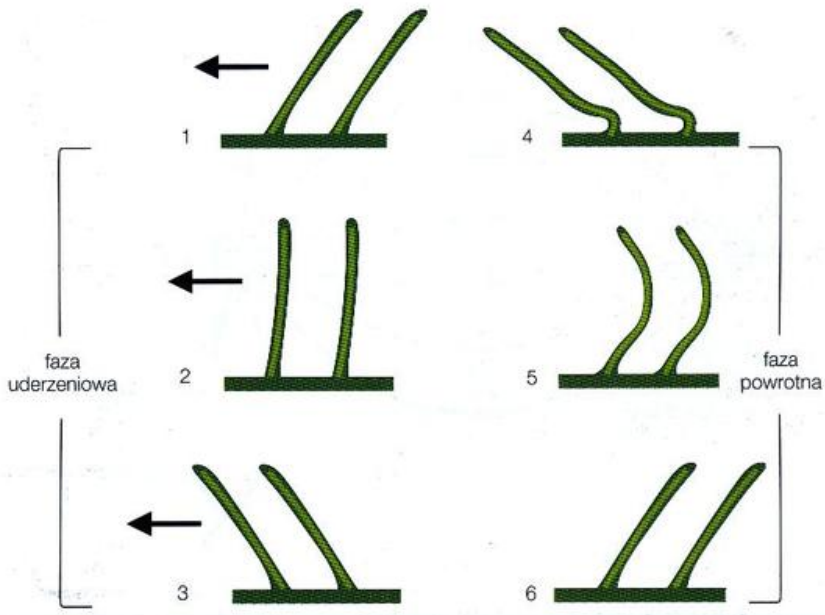
Centriole są krótkimi walcami, których ściana jest zbudowana z 9 tripletów mikrotubul. Zwykle w komórce występuje para centrioli położonych w okolicach jądra (ryc. 7.5 i 7.11). Obie centriole są ustawione prostopadle do siebie i otoczone materiałem centrosomu. Podobnie do centrioli zbudowane są ciałka podstawowe, które są centrami nukleacji dla aksonem rzęsek i witek. **Aksonema**, będąca rdzeniem rzęsek i witek, jest jednak zbudowana z 9 dubletów mikrotubul wyrastających z tripletów ciałek podstawowych. Dodatkowo w centrum aksonemy występują dwie połączone mikrotubule, które nie mają swojego odpowiednika w ciałku podstawowym. Stabilność mikrotubul rzęsek zapewniają MAP, a ruch całej mikrotubuli aksonemy zależy od dyneiny. Białko to różni się nieco od **dyneiny** występującej w cytoplazmie i dlatego określa się je tutaj **dyneiną rzęskową (aksonemalną)**. Ogon dyneiny łączy się z jednym z dubletów, a główki mają kontakt z dubletem sąsiednim (ryc. 7.11). Na zasadzie podobnej jak w przypadku dyneiny cytoplazmatycznej, dyneina rzęskowa kroczy po tubulinach dubletów. Ponieważ dublety są silnie umocowane do siebie i do ciałek podstawowych, nie występuje przesuwanie się dubletów względem siebie, lecz ich uginanie się, co nadaje rzęskom charakterystyczny ruch, przedstawiony na rycinie 7.12. Ogólny plan układu mikrotubul w aksonemie witek plemników jest identyczny. Witki są jednak znacznie dłuższe od rzęsek, a ich ruch przypomina falowanie. Duże liczby rzęsek występują na komórkach dróg oddechowych, gdzie umożliwiają przesuwanie śluzu na powierzchni światła oskrzeli i tchawicy, usuwając przylepione do śluzu zanieczyszczenia z powietrza. Podobnie dużo rzęsek jest także na komórkach nabłonkowych jajowodów, gdzie umożliwiają przesuwanie się jaja do światła macicy. W obu przypadkach ruch rzęsek musi być tak zsynchronizowany, aby transportowane składniki przesuwały się w jednym określonym kierunku. Mechanizm ten został przedstawiony na rycinie 7.13.



Rycina 7.11 Układ mikrotubul w rzęskach i witkach: **a.** przekrój poprzeczny rzęski w mikroskopie elektronowym, pokazujący typowy układ mikrotubul tworzących aksonemę. Obwodowo występuje 9 dubletów mikrotubul oraz dwie pojedyncze mikrotubule w środku. Elektronogram dzięki uprzejmości prof. Renaty Brelińskiej i dr Agnieszki Malińskiej. **b.** schematyczny układ mikrotubul oraz struktur towarzyszących na przekroju poprzecznym rzęski (wg B. Alberts i wsp.).



Rycina 7.12 Znaczenie dyneiny w przemieszczaniu się mikrotubul: **a.** dyneina (*niebieska*) izolowanych mikrotubul wici (pozbawionych MAP) w obecności ATP przemieszcza mikrotubule względem siebie; **b.** dyneina w witce (MAP umocowują mikrotubule względem siebie) powoduje uginanie się witki (wg B. Alberts i wsp.).



Rycina 7.13 Synchronizacja ruchu rzęski generuje siłę skierowaną w jednym kierunku (*strzałka*). Każdy cykl, trwający ok. 0,1–0,2 s, składa się z szybkiej fazy uderzeniowej (1–3) i wolnej fazy powrotnej (4–6), co umożliwia przesuwanie cząsteczek na powierzchni komórek w określonym kierunku (wg B. Alberts i wsp.).

KLINIKA

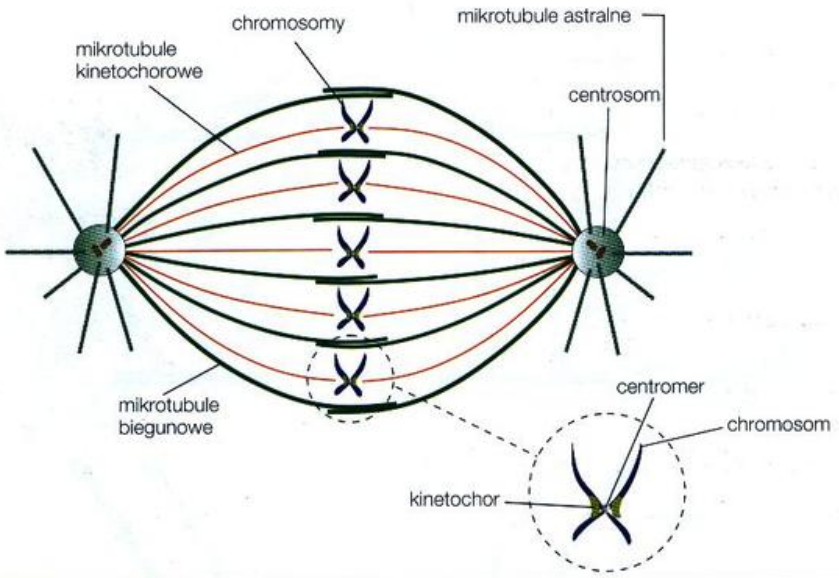
Nieprawidłowości w budowie aksonemy, przejawiające się np. brakiem ramion dyneinowych i mikrotubul centralnych lub przesunięciami mikrotubul obwodowych, uniemożliwiają poruszanie się rzęsek lub wici i są przyczyną choroby zwanej zespołem nieruchomych rzęsek lub zespołem Kartagenera. Objawami klinicznymi tej choroby są częste zapalenia oskrzeli, a u mężczyzn nieruchliwość plemników.

We wrodzonym **zespole Bardeta-Biedla** (mutacje w genach *BBS*) dochodzi do zaburzeń w transporcie białek wewnątrz rzęsek, co powoduje wtórnie nieprawidłowości budowy ciałek podstawowych i rzęsek. W efekcie występują zmiany wielonarządowe, w tym dystrofia siatkówki, wielotorbielowatość nerek, przewlekłe zapalenia oskrzeli, brak rozwoju ogonków plemników.

Innym składnikiem komórki zbudowanym z mikrotubul jest **wrzeciono kariokinetyczne**, które jest odpowiedzialne za właściwą lokalizację chromosomów oraz ruchy chromosomów (chromatyd) do biegunów komórkowych w czasie podziału. W interfazie dochodzi do replikacji centrioli, a w profazie do ich przemieszczania się do biegunów komórkowych, co stopniowo powoduje rozpad mikrotubul cytoplazmatycznych. Z uwolnionej tubuliny powstają nowe mikrotubule tworzące wrzeciono kariokinetyczne (ryc. 7.14). **Mikrotubule kinetochorowe** utrzymują początkowo chromosomy w płytce metafazalnej. **Mikrotubule astralne** łączą centrosomy z białkami kory komórki, co przyczynia się do właściwego ustalenia pozycji całego wrzeciona. Trzeci rodzaj to **mikrotubule biegunowe**, które łącząc się ze sobą, stabilizują cały układ. Białka oczapkowujące zapewniają mikrotubulom wrzeciona czasową stabilność. Mechanizm przemieszczania chromatyd do biegunów komórki nie jest poznany. Uważa się, że proces ten zachodzi dzięki kompleksowi białek dyneina/dynaktyna dołączonemu do kinetochoru i uwalniającemu kolejne GDP-tubuliny, co skraca mikrotubule kinetochorowe i przybliża chromosom do centrosomu (ryc. 7.14). Tu należy przypomnieć, że część cytostatyków hamuje podział komórek, czyli np. rozwój nowotworów, poprzez dezorganizację powstawania lub funkcjonowania wrzeciona kariokinetycznego (s. 134, tab. 7.1).

Filamenty pośrednie

Nazwa filamentów pochodzi od ich średnicy wynoszącej ok. 10 nm, czyli pośredniej między średnicami filamentów aktynowych i mikrotubul. Filamenty te są bardzo stabilne i wytrzymałe na rozciąganie oraz



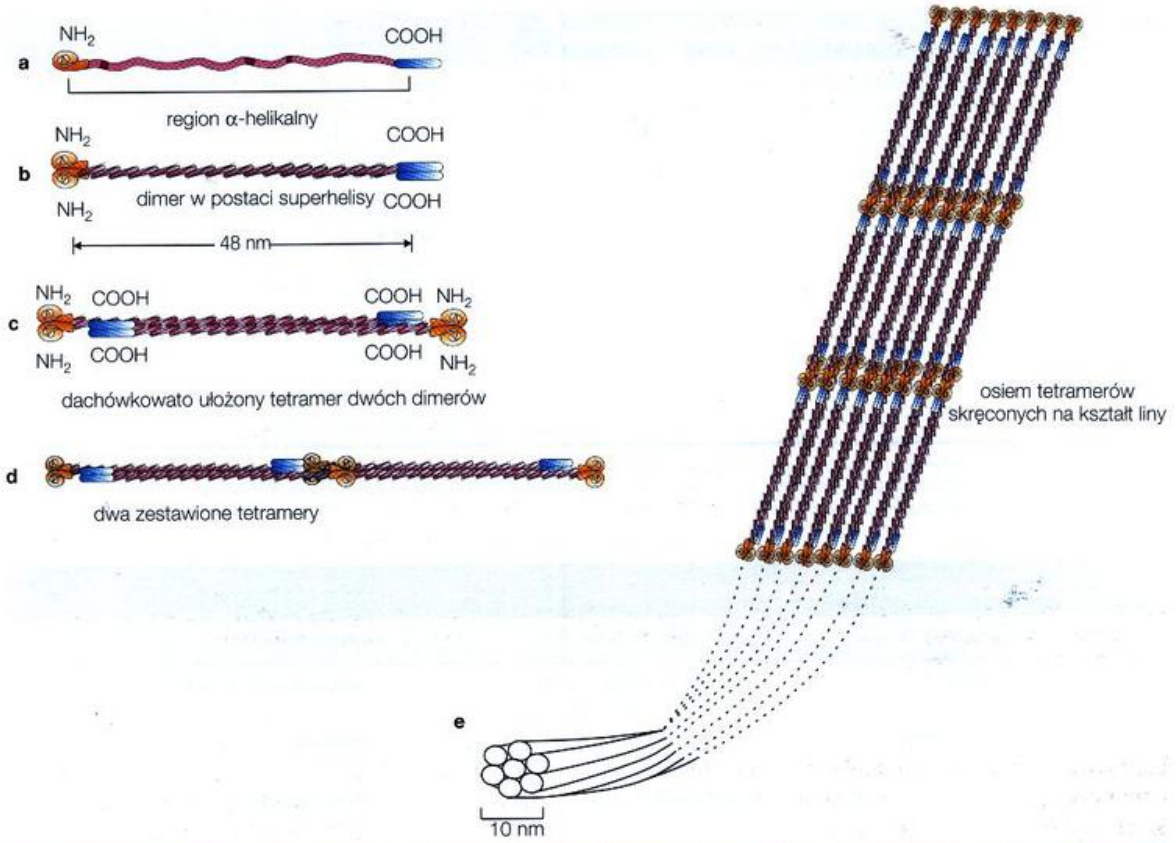
Rycina 7.14 Organizacja wrzeciona kariokinetycznego w metafazie. Wyróżnia się trzy rodzaje mikrotubul: kinetochorowe, astralne i biegunowe. Rolę poszczególnych rodzajów opisano w tekście (wg Goodmanna). W kółku zaznaczono położenie kinetochoru, białek otaczających centromer, czyli miejsce połączenia chromosomów.

bardzo odporne na działanie różnych związków chemicznych. Filamenty pośrednie nadają komórkom wytrzymałość mechaniczną. W niektórych tkankach filamenty sąsiednich komórek łączą się pośrednio, za pomocą białek połączeń międzykomórkowych, nadając tkankom dużą wytrzymałość, np. w naskórku, komórkach mięśniowych.

Budowa i klasyfikacja filamentów pośrednich

Wytrzymałość filamentów pośrednich wynika z ich budowy. Jednostką strukturalną jest **białko włókienkowe**, zwane **monomerem** (ryc. 7.15). Najdłuższa część środkowa tego białka ma charakter α-helisy, a na N-jej końcu znajduje się głowa i na C-końcu ogon. Białka włókienkowe tworzą **dimery** przez nawinięcie się odcinków środkowych wokół siebie (superhelisa) z głowami na jednym końcu. Proces ten jest regulowany przez fosforylację/defosforylację monomerów, np. fosforylacja monomerów lamin w profazie powoduje czasowy rozpad włókienek jądrowych i w efekcie rozpad otoczki jądrowej. Dwa dimery łączą się przeciwbieżnie bok do boku i wytwarzają tetramer. **Tetramery** występują częściowo jako niezwiązane w cytoplazmie i dlatego uważa się je za elementy struktury filamentów pośrednich. Tetramery łączą się ze sobą koniec do końca (tworząc protofilament), a potem bok do boku, formując ostatecznie protofibrylę, czyli filament pośredni. Są one zawsze tej samej grubości, gdyż na przekroju poprzecznym występuje zawsze 8 tetramerów. Odcinki środkowe białek tworzących filamenty pośrednie mają bardzo podobną budowę i dlatego wszystkie filamenty pośrednie są składane w podobny sposób, mają podobną grubość i wytrzymałość. Końcówki globularne, czyli głowy poszczególnych białek, wystają jakby na powierzchni filamentu i służą głównie do połączeń z innymi składnikami cytoszkieletu lub błoną komórkową. Końcówki te różnią się bardzo w poszczególnych rodzajach filamentów, co nadaje im pewną swoistość.

Znanych jest kilka zasadniczych rodzajów białek budujących filamenty pośrednie (tab. 7.4 i 7.5). Większość z nich znajduje się w cytoplazmie, a **lamina** występuje w jądrze komórkowym. Część białek tworzy homodimery. Część łączy się natomiast w pary z innymi białkami, tworząc heterodimery. Jako homodimery występują **filamenty cytokeratynowe**, **neurofilamenty** i **filamenty wimentynowe**. **Desmina i kwaśne białko glejowe** (GFAP) wytwarzają heterodimery z wimentyną i dlatego zalicza się je do tzw. filamentów wimentynopodobnych. Pamiętać jednak należy, że w obrębie cytokeratyn, neurokeratyn i lamin jądrowych może występować wiele podtypów tych białek i najczęściej łączą się one w dimery z innymi podtypami.



Rycina 7.15 Budowa filamentu pośredniego: **a**. monomer filamentu pośredniego składa się z wydłużonej części środkowej zakończonej na obu końcach częściami globularnymi; **b** i **c**. dwa monomery owijają się dookoła siebie, tworząc dimer, a dwa dimery łączą się dachówkowato, tworząc tetramer; **d** i **e**. tetramery łączą się koniec z końcem, a następnie skręcają się, tworząc linopodobny filament pośredni (zmodyfikowane wg B. Alberts i wsp.).

KLINIKA

Każdy z typów filamentów pośrednich jest charakterystyczny dla poszczególnych tkanek (tab. 7.5). Jest to wykorzystywane w badaniach immunocytochemicznych przez histopatologów do rozpoznawania rodzajów tkanek w przypadkach chorobowych, gdy budowa komórkowa i tkankowa może być silnie zmieniona, np. w nowotworach. Określanie podtypów białek, np. cytokeratyn, umożliwia bardziej dokładną ocenę pochodzenia komórek (np. czy z nabłonka jelitowego czy naskórka) oraz stopnia różnicowania komórek.

Rola filamentów pośrednich

Filamenty pośrednie tworzą pęczki lub sieci przyczepiające się do błony komórkowej i otoczki jądrowej oraz łączą się z innymi składnikami cytoszkieletu. Połączenia te zachodzą dzięki białkom towarzyszącym filamentów pośrednich (**IFAP**), np. syneminie i skeleminie w komórkach mięśni szkieletowych i filagrynie w komórkach nabłonkowych.

Jak już wspomniano, podstawową rolą filamentów pośrednich jest zapewnienie komórkom i tkankom wytrzymałości mechanicznej. Najlepiej widać to w nabłonkach pokrywających. Sieci filamentów pośrednich (zwanych tu tonofilamentami) łączą się z białkami **połączeń międzykomórkowych**, np. desmoplakinami w desmosomach i hemidesmosomach. Łączenie się komórek między sobą za pomocą desmosomów oraz z błoną podstawną za pomocą hemidesmosomów stanowi o wytrzymałości mechanicznej tkanki (ryc. 7.16).

Tabela 7.4 Główne rodzaje białek wchodzących w skład filamentów pośrednich

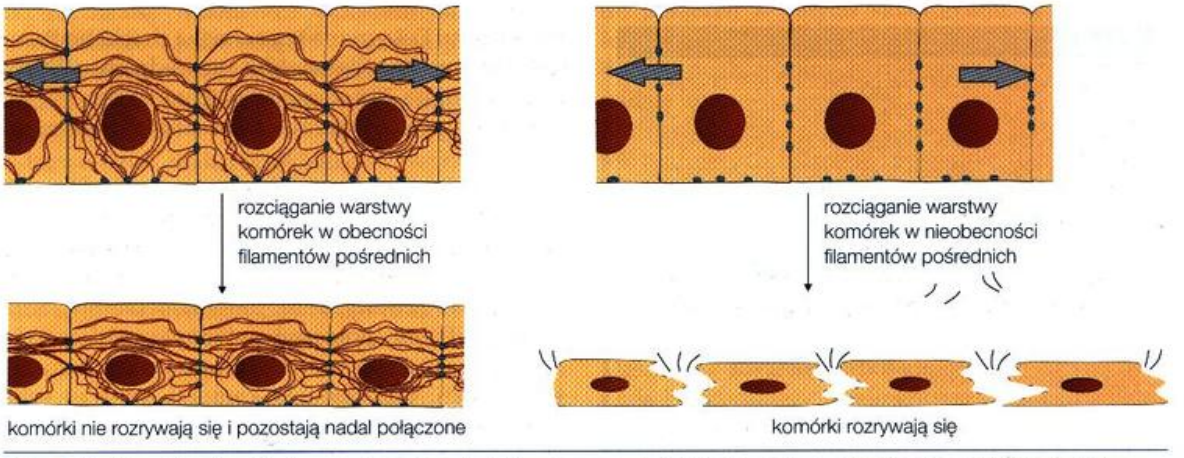
Rodzaj białka	Masa cząsteczkowa (kD)	Liczba znanych podtypów	Podstawowe występowanie
Cytokeratyny			
typ I (kwaśne)	40–56,5	ok. 20	komórki nabłonkowe i ich wytwory, np. włosy, paznokcie, płytki rogowe skóry
typ II (zasadowe)	53–70	ok. 18	
Wimentyna i podobne			
wimentyna	55	1	komórki mezenchymalne
desmina	53	1	komórki mięśniowe
GAFP[1]	51	1	niektóre komórki glejowe
Białko neurofilamentów			neutrony
NF-L (lekkie)	60–70	1	
NF-M (średnie)	110	1	
NF-H (ciężkie)	135–150	1	
Laminy jądrowe	65–75	3 (A, B i C)	jądra wszystkich komórek

[1] GAFP – kwaśne włókniste białko gleju.
Istnieją też, występujące w mniejszych ilościach, inne białka filamentów pośrednich, np. nestyna – 200 kD, która występuje w rozwijających się neuronach, i peryferyna – 66 kD, która występuje w neuronach dojrzałych w połączeniu z białkami neurofilamentów.

Tabela 7.5 Rodzaje filamentów pośrednich i swoistość komórkowa[1]

Rodzaje filamentów pośrednich	Rodzaj budującego białka	Występowanie
Cytokeratynowe (keratynowe)	keratyna (heterodimery różnych typów, np. keratyna 1, keratyna 10)	cytoplazma komórek nabłonkowych
Neurokeratynowe (neurofilamenty)	neurokeratyna (heterodimery różnych typów neurokeratyn)	cytoplazma neuronów
Wimentynowe	homodimery wimentyny	cytoplazma fibroblastów i innych komórek mezenchymalnych
Glejowe (neuroglejowe)	heterodimery wimentyny i GAFP	cytoplazma komórek glejowych
Desminowe	heterodimery wimentyny i desminy	cytoplazma komórek mięśniowych
Laminowe (jądrowe)	lamina (heterodimery różnych typów lamin)	jądra wszystkich komórek

[1] Czasami stosuje się też nazwy numeryczne: filamenty typu I i II dla keratynowych kwaśnych i zasadowych, typu III dla wimentynowych i wimentynopodobnych, typu IV dla neurofilamentów i typu V dla jądrowych.



Rycina 7.16 W komórkach nabłonkowych filamenty pośrednie wytwarzają sieci, które łączą się za pomocą połączeń międzykomórkowych z podobnymi sieciami w komórkach sąsiednich i białkami włóknistymi błony podstawnej. Taki układ nadaje wytrzymałość nie tylko komórce, ale i całej tkance. Same połączenia międzykomórkowe nie chroniłyby tkanek przed rozciąganiem i dochodziłoby do ich rozerwania (zmodyfikowane wg B. Alberts i wsp.).

KLINIKA

O istotnej roli, jaką w komórkach nabłonka okrywającego pełnią filamenty pośrednie, świadczyć mogą objawy chorobowe, które towarzyszą genetycznie uwarunkowanym **defektom filamentów keratynowych**. Choroba, nazwana zwykłym pęcherzowym oddzieleniem się naskórka (*epidermolysis bullosa simplex*), charakteryzuje się znacznym osłabieniem wytrzymałości naskórka, czego objawem jest pojawianie się na powierzchni skóry licznych pęcherzy powstających na skutek nawet delikatnych obrażeń. Bezpośrednią przyczyną schorzenia jest nieprawidłowość w strukturze filamentów cytokeratynowych powstała w następstwie rzadko spotykanej mutacji w obrębie genu kodującego keratyny 5 i 14. Wrodzona rybia łuska (*epidermolytic hyperkeratosis*) to nadmierne rogowacenie naskórka jako wynik mutacji genów dla keratyny 1 i 10. Rzadko występuje też rogowiec dłoni i stóp (*epidermolytic plantopalmar keratoderma*) w wyniku mutacji genu dla keratyny 9. Od tych genodermatoz odróżnić należy choroby autoimmunoagresyjne, pęcherzyce i pemfigoid. W pęcherzycy zwykłej tworzą się pęcherze śródnaskórkowe jako efekt działania autoprzeciwciał IgG skierowanych przeciwko desmoglenie 3 obecnej w desmosomach. Natomiast w pemfigoidzie pęcherzowym (najczęściej wywołanym przez leki) powstają pęcherze podnabłonkowe, gdyż autoprzeciwciała IgG skierowane są przeciwko białkom tworzącym hemidesmosomy, np. plektynie, integrynie alfa6-beta4 czy lamininie 5.

Podobną funkcję stabilizującą pełnią również filamenty pośrednie w innych typach tkanek. Bogato rozbudowane neurofilamenty utrzymują prawidłową konstrukcję niezwykle wydłużonych wypustek komórek nerwowych. Filamenty desminowe także mają istotny wpływ na rozkurcz mięśni. Obecność trwałych i zorganizowanych przestrzennie sieci filamentów pośrednich może mieć również wpływ na utrzymanie właściwej lokalizacji oraz kształtu niektórych organelli komórkowych, np. obecne wokół jądra komórkowego filamenty decydują o jego pozycji w komórce, a tworzące blaszkę jądrową filamenty laminowe wpływają na jego kształt.

KLINIKA

Grupę chorób wywołaną nieprawidłowościami w budowie lamin jądrowych nazywa się **laminopatiami**. Ze względu na ich lokalizację tkankową zalicza się je do dystrofii mięśniowych, dystrofii lipidowych lub neuropatii. Częstą laminopatią jest choroba Charcota-Marie'a-Tootha typu 2B1, objawiająca się zaburzeniami ruchowo-czuciowymi kończyn górnych i dolnych. Natomiast choroba Charcota-Marie'a-Tootha typu 1, powodująca podobne objawy, jest efektem mutacji genu dla koneksyny 23 w komórkach Schwanna, co powoduje uszkodzenie mieliny.

Mikrofilamenty

Mikrofilamenty są zbudowane głównie z **aktyny** i dlatego często nazywa się je filamentami aktynowymi. Aktyna jest jednym z najobficiej występujących białek komórkowych; w komórkach mięśniowych stanowi 20%, a w niemięśniowych do 5% ogólnej masy białek. Znaczenie filamentów aktynowych jest związane z ruchem całych komórek lub ich fragmentów, kurczeniem się oraz przemieszczaniem niektórych organelli komórkowych. Ponadto specjalne struktury wytwarzane przez te filamenty, w powiązaniu z innymi białkami, nadają kształt komórce i umocowują komórki do innych komórek i błon podstawnych.

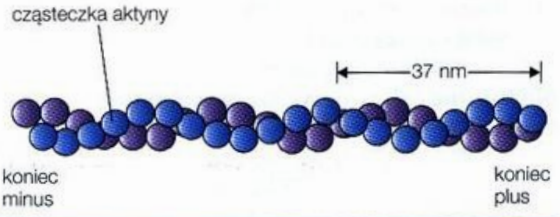
Budowa mikrofilamentów i białka wiążące aktynę

Mikrofilamenty mają średnicę ok. 7 nm. Mogą być **niestabilne** lub tworzyć wiele **stabilnych** struktur komórkowych. Stabilizację i funkcję tych filamentów, podobnie jak MAP w przypadku mikrotubul, zapewniają białka wiążące aktynę (ABP). Część stabilnych filamentów aktynowych występuje w większości komórek, np. w korze komórki, a niektóre tylko w komórkach wyspecjalizowanych, np. w miofilamentach lub mikrokosmkach. Mniej stabilne filamenty aktynowe mogą pojawiać się w komórkach okresowo, np. pierścienie kurczliwe i włókienka naprężeniowe (stresowe). Niezależnie od pełnionych funkcji i występowania, filamenty aktynowe mają podobną budowę.

Filamenty aktynowe są polimerami składającymi się z globularnej **aktyny G** (42 kD). Znanych jest kilka izoform aktyny G; podstawowe to aktyna α, aktyna β i aktyna γ. Aktyna α jest charakterystyczna dla mięśni, ale wyróżnia się tu podtypy swoiste dla mięśni szkieletowych, mięśnia sercowego i mięśni gładkich naczyń krwionośnych. Aktyna β występuje w cytoplazmie większości komórek, a aktyna γ w mięśniach gładkich trzewi. Niezależnie od izoformy, aktyna G polimeryzuje, tworząc wydłużone cząsteczki aktyny F. Dwie nici **aktyny F** okręcają się dookoła siebie, tworząc filament aktynowy.

Cząsteczki aktyny G są spolaryzowane i ułożone zawsze w tym samym kierunku, co powoduje, że filament aktynowy jest także spolaryzowany. Wyróżnia się tutaj koniec plus i koniec minus, podobnie jak w przypadku mikrotubul (ryc. 7.17). Polaryzacja ta ma istotne znaczenie funkcjonalne, ponieważ – podobnie jak w mikrotubulach – ukierunkowuje to przemieszczanie się białek towarzyszących, które tutaj określa się także białkami motorycznymi.

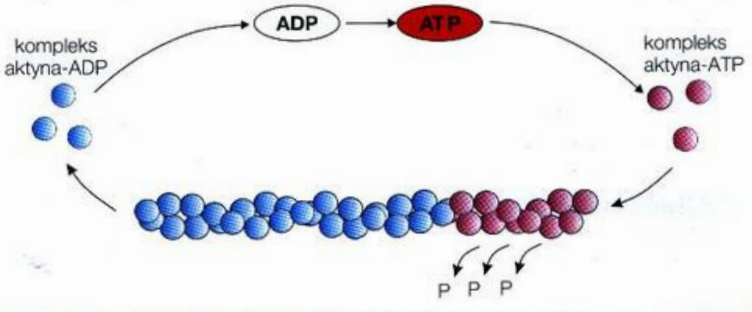
Polimeryzacja monomerów aktyny G może zachodzić jedynie w przypadku, gdy jest związana z cząsteczką ATP. W warunkach *in vitro* aktyna G połączona z ATP może dołączać się do filamentu, a kolejna przyłączona cząsteczka powoduje hydrolizę ATP do ADP. Cząsteczki z ADP nie mogą polimeryzować i łatwo odczepiają się od filamentu, wywołując stopniowo jego depolimeryzację (ryc. 7.18). Dodanie pewnych substancji egzogennych może zmieniać ten proces. Są to głównie toksyny uzyskiwane z grzybów. Alkaloid cytochalazyna (typ D) lub latrunkulina łączą się z aktyną G, blokując polimeryzację, a faloidyna (cykliczny polipeptyd z muchomora sromotnikowego) łączy się z aktyną F i stabilizuje filamenty. Toksyny te są używane w badaniach cytologicznych, np. faloidyna wyznakowana fluorochromem jest wykorzystywana do określenia lokalizacji filamentów aktynowych.



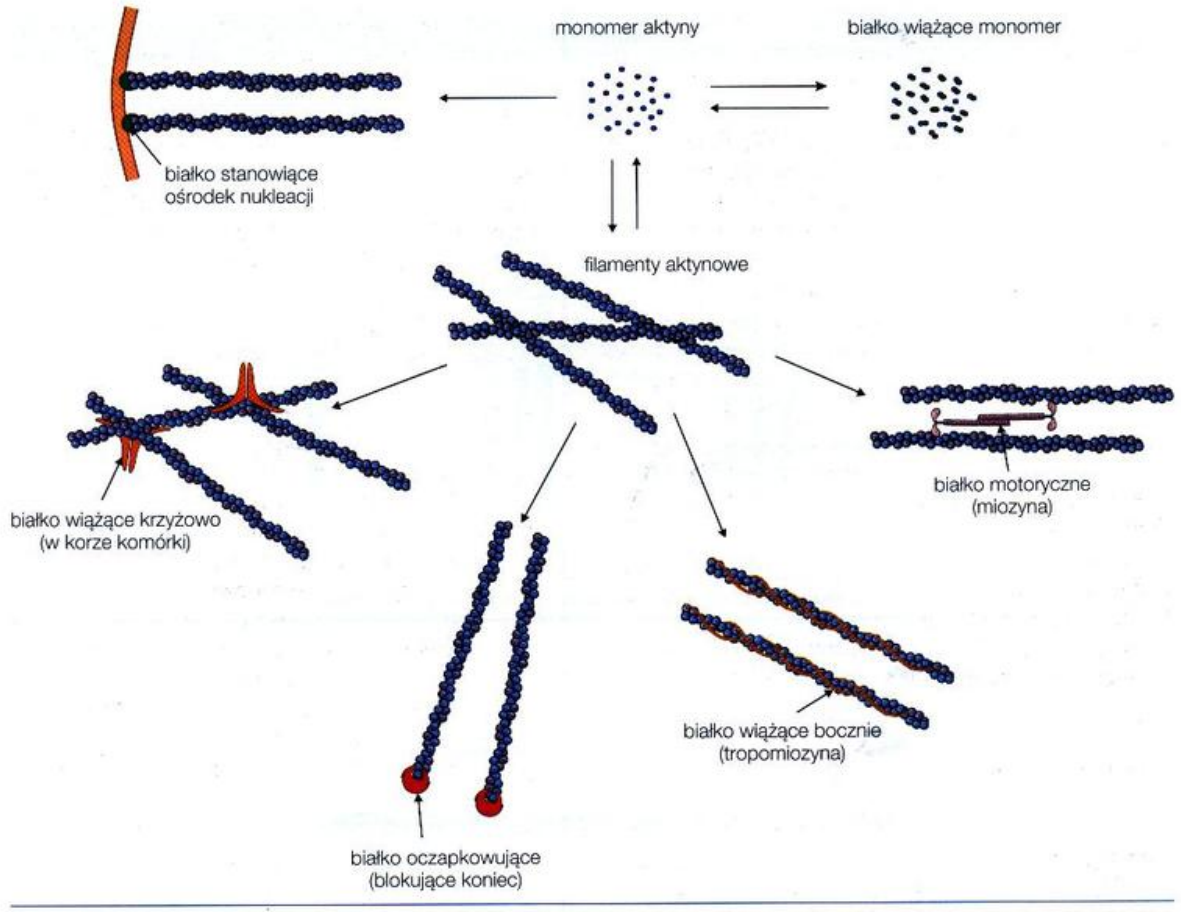
Rycina 7.17 Budowa filamentu aktynowego. Uporządkowane ułożenie cząsteczek w filamencie powoduje, że filament ma koniec plus i minus; dwie nici cząsteczek aktyny są okręcone wokół siebie, a pełny obrót ma długość ok. 37 nm. Poszczególne cząsteczki aktyny przylegają silnie do siebie, co zapobiega ich rozdzieleniu (zmodyfikowane wg B. Alberts i wsp.).

W komórkach procesy polimeryzacji i depolimeryzacji, a także stabilność filamentów aktynowych są regulowane przez **białka wiążące aktynę** (**ABP** – ang. *actin binding proteins*) (ryc. 7.19, tab. 7.6). Uważa się, że w komórkach cały czas dochodzi do wymiany cząsteczek aktyny G na obu końcach filamentów, na końcu plus są dobudowywane, a na końcu minus oddysocjowują; można by to nazwać „dynamiczną stabilnością". Połowa aktyny G występuje w komórce w połączeniu z białkami wiążącymi monomer (np. tymozyną β_4), które zapobiegają ich polimeryzacji. Inne ABP (np. profilina) ułatwiają polimeryzację w aktynę F, a jeszcze inne (np. fimbryna, α-aktynina) decydują o organizacji filamentów w pęczki lub sieci. W pęczkach filamenty są ułożone równolegle i uwzględniając ich polarność, najczęściej mają układ przeciwbieżny. Obecna między nimi miozyna II przesuwa je między sobą, powodując ruch lub skurcz komórki. Czasami jednak w pęczkach filamenty są spolaryzowane w jednym kierunku, np. w mikrokosmkach lub filopodiach. Filamenty aktynowe mogą być też łączone w sieci (np. przez filaminę), co nadaje galaretowaty i lepki charakter cytoplazmy, zwany żelem. W obecności jonów wapnia gelsolina (rodzaj białka wiążącego aktynę) zrywa wiązania krzyżowe filaminy i skraca filamenty aktynowe, co wpływa na zwiększenie płynności tej części cytoplazmy, czyli zamianę żelu w zol. Do takiej sytuacji dochodzi, np. w kolbce synaptycznej, co ułatwia fuzję pęcherzyków synaptycznych z błoną komórkową. Odrębną czynnościowo grupą ABP są białka motoryczne (zob. dalej).

Obecność odpowiednich ABP decyduje o stabilności i funkcji struktur utworzonych przez filamen-



Rycina 7.18 Podczas polimeryzacji aktyny w filament monomery aktyny muszą być związane z ATP, który hydrolizuje do ADP po włączeniu cząsteczki do filamentu. Oddysocjowane z filamentu cząsteczki aktyny są związane z ADP i mogą być ponownie dołączone do filamentu po wymianie ADP na ATP (zmodyfikowane wg B. Alberts i wsp.).



Rycina 7.19 Główne funkcje białek wiążących aktynę (ABP). Aktyna jest zaznaczona kolorem niebieskim, a białka wiążące innymi kolorami (zmodyfikowane wg B. Alberts i wsp.).

ty aktynowe. Obok bardzo stabilnych struktur, jak kora komórki, mikrokosmki i miofibryle, filamenty aktynowe mogą wytwarzać wiele struktur mniej stabilnych. Do struktur mniej stabilnych zalicza się lamelipodia i filopodia, które są okresowo występującymi wypustkami umożliwiającymi przemieszczanie się całej komórki; szczegóły tego procesu przedstawione zostały na rycinach 7.20 i 7.21. Innymi okresowo pojawiającymi się strukturami aktynowymi w większości komórek są pierścień kurczliwy i włókienka naprężeniowe. Pierścień kurczliwy pojawia się w komórkach po zakończonej kariokinezie i jego aktywność prowadzi do cytokinezy, czyli rozdzielenia się komórek potomnych (zob. rozdz. 3). Włókienka naprężeniowe najlepiej opisano w fibroblastach, w których umożliwiają przyczepienie się do podłoża, co ma istotne znaczenie w umiejscowieniu komórek w otoczeniu (ryc. 7.22).

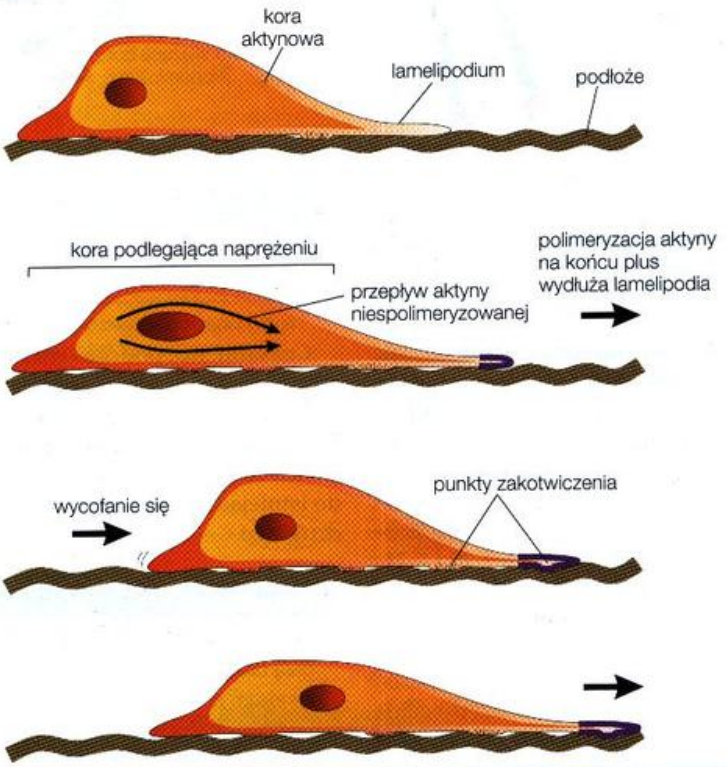
Czasami, np. podczas ruchu komórki lub przyłączania się do innych komórek lub struktur, filamenty aktynowe mogą tworzyć odgałęzienia boczne. Umożliwia to specjalny kompleks białek **Arp 2/3** (*action-related proteins*), który przyczepia się bocznie do istniejącego filamentu, umożliwiając wzrost tego drugiego.

KLINIKA

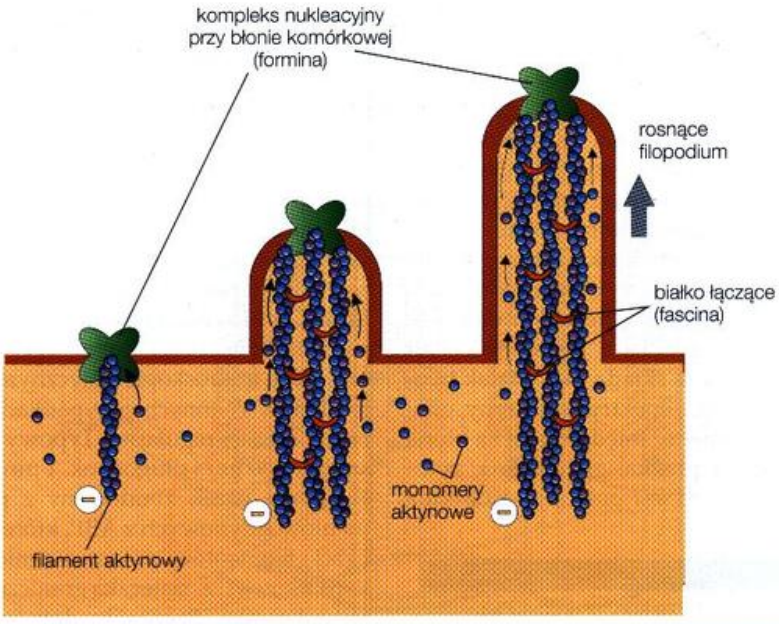
Białka Arp 2/3 do pełnienia swojej funkcji wymagają białek aktywacyjnych WASP (*Wiskott-Aldrich syndrom proteins*) należących do rodziny białek kontraktyny istotnych m.in. w przemieszczaniu się limfocytów. Mutacja genu *WASP* (na chromosomie X) wywołuje **zespół Wiskotta-Aldricha**, objawiający się m.in. uporczywymi infekcjami dróg oddechowych oraz skóry, jako efekt upośledzonej funkcji limfocytów T i B.

Tabela 7.6 Białka wiążące aktynę (ważniejsze z nich wytłuszczono)

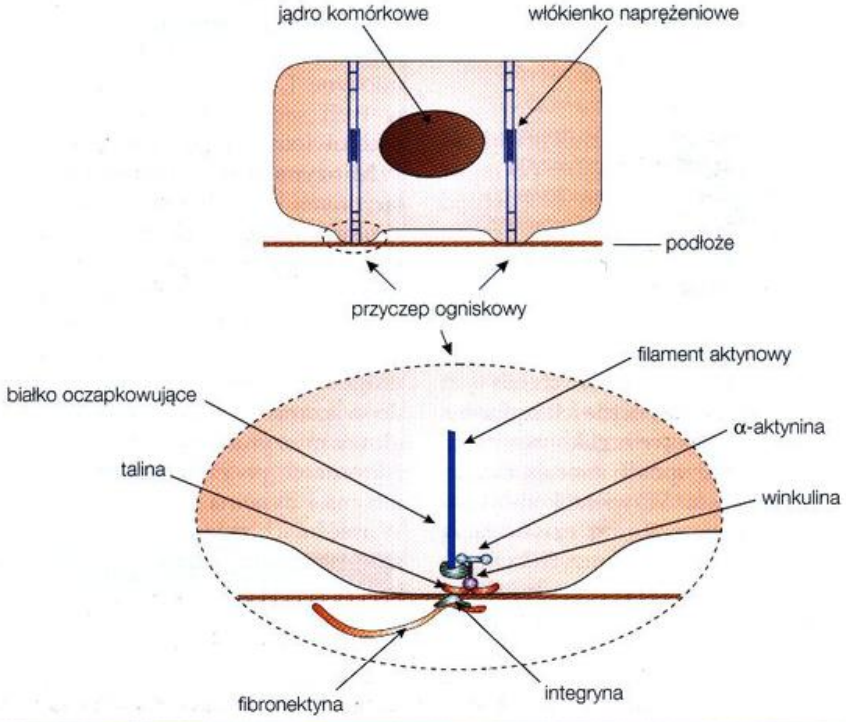
Rodzaj białka	Funkcja
Tropomiozyna	stabilizacja filamentów
Fimbryna	wiązanie filamentów
Wilina	wiązanie filamentów
Winkulina	wiązanie filamentów
α-aktynina	wiązanie filamentów
Filamina	wiązania krzyżowe filamentów
Spektryna I i II	wiązania krzyżowe filamentów do błony komórkowej
Gelsolina	fragmentacja filamentów i wiązań krzyżowych
Ankiryna	wiązania krzyżowe filamentów do błony komórkowej
Miozyna II	przesuwanie filamentów w mięśniach
Miozyna I i V	przemieszcza struktury błoniaste po filamentach
Profilina	łączy monomery aktyny
Tymozyna β_4	inhibitor polimeryzacji aktyny
Cap Z	oczapkowanie końców plus filamentów
Formina	oczapkowanie końców plus filamentów
Kofilina	hamuje polimeryzację aktyny G
Dystrofina	białko kory komórki w mięśniach szkieletowych
Titina	wiązanie miofilamentów grubych z liniami Z
Nebulina	regulacja długości miofilamentów cienkich
Kaldesmon	białko wiążące aktynę w mięśniach gładkich blokujące kontakt z miozyną



Rycina 7.20 Przemieszczanie się komórki po podłożu (np. błonie podstawnej). Lamelipodium jest cienką blaszką cytoplazmy zwróconą w kierunku ruchu komórki; blaszka ta zawiera duże ilości filamentów aktynowych. Nowo tworzące się filamenty aktynowe tworzą palczaste wypustki cytoplazmy, zwane filopodiami, które zaczynają łączyć się z podłożem, co wytwarza naprężenia powodujące oderwanie się od podłoża części tylnej komórki. W tylnej części dochodzi do depolimeryzacji filamentów i uwolniona aktyna przemieszcza się do przodu. Powtarzanie się tego cyklu przesuwa komórkę dalej (zmodyfikowane wg B. Alberts i wsp.).



Rycina 7.21 Filopodia tworzą się na silnie rozpłaszczonej części wiodacej (lamelipodium) przemieszczającej się komórki. Tworzenie się filopodiów, uzależnione od obecności białek nukleacyjnych w błonie komórkowej, które umożliwiają polimeryzację aktyny i wytworzenie mikrofilamentów (zmodyfi kowane wg B. Alberts i wsp.).



Rycina 7.22 Podczas kontaktu komórki z podłożem może dochodzić do wytworzenia się przyczepów ogniskowych, w których dzięki licznym białkom są zakotwiczone filamenty aktynowe tworzące włókienka naprężeniowe. Włókienka te wraz z innymi filamentami komórki i białkami motorycznymi uczestniczą w przytwierdzaniu komórki do podłoża, np. fibronektyny (zmodyfikowane wg B. Alberts i wsp.).

Kora komórki

Duże skupiska filamentów aktynowych obserwuje się w większości komórek pod plazmalemmą. Tworzą tutaj strukturę nazywaną korą komórki. Najlepiej struktura ta została poznana w erytrocytach, w których decyduje o charakterystycznym kształcie tych krwinek i zwiększa ich wytrzymałość. Podobne układy występują w innych komórkach.

W korze erytrocytów, obok aktyny, występuje także duża liczba białek, które bezpośrednio lub pośrednio łączą się z aktyną i błoną komórkową, wytwarzając silną sieć, nadającą komórce kształt i elastyczność. Struktura ta składa się z białek tworzących krótkie filamenty – spektryny i aktyny, oraz białek łączących te filamenty między sobą i z błoną komórkową: białko 4.1 prążka, glikoforyna, ankiryna i białko 3 prążka, co jest pokazane i opisane w rozdziale 6.

KLINIKA

Nieprawidłowości w strukturze kory erytrocytu są przyczyną kilku chorób wrodzonych, zaliczanych do **niedokrwistości**, w których erytrocyty mają nieprawidłowe kształty i osłabioną błonę komórkową. Powoduje to łatwe pękanie krwinek, czyli hemolizę, co jest przyczyną upośledzonego transportu tlenu we krwi. Wrodzona sferocytoza (erytrocyty są kuliste) jest wywołana nieprawidłową budową spektryny, która nie może wiązać się z białkiem 4.1. We wrodzonej eliptocytozie (erytrocyty są elipsoidalne) nieprawidłowa budowa spektryny uniemożliwia tworzenie dimerów i filamentów spektrynowych. Pierwotną przyczyną w niedokrwistości sierpowatej jest nieprawidłowa budowa cząsteczki hemoglobiny, ale wtórnie prowadzi to do zmian w potranslacyjnej modyfikacji aktyny, co powoduje nieprawidłowy sierpowaty kształt komórek.

W innych komórkach kora ma podobną strukturę jak w erytrocytach i składa się z podobnych lub tych samych białek, chociaż występują liczne ich izoformy. Białka te łączą filamenty aktynowe z glikoproteinami błon komórkowych i w ten sposób mocują cytoszkielet do błony komórkowej. W wielu komórkach nabłonkowych spektryna typu II oraz ezryna łączą dodatkowo pęczki filamentów aktynowych cytoplazmatycznych, wytwarzając większą strukturę, zwaną siateczką graniczną, która łączy się z połączeniami międzykomórkowymi typu zwierającego. W komórkach mięśniowych rolę spektryny odgrywa dystrofina, a w płytkach krwi – filamina. W neurocytach natomiast fodryna (izoforma spektryny) łączy się dodatkowo z neurotubulami, neurofilamentami, niektórymi organellami oraz pęcherzykami synaptycznymi. To ostatnie połączenie w kolbce synaptycznej umożliwia egzocytozę neuroprzekaźników.

Mikrokosmki

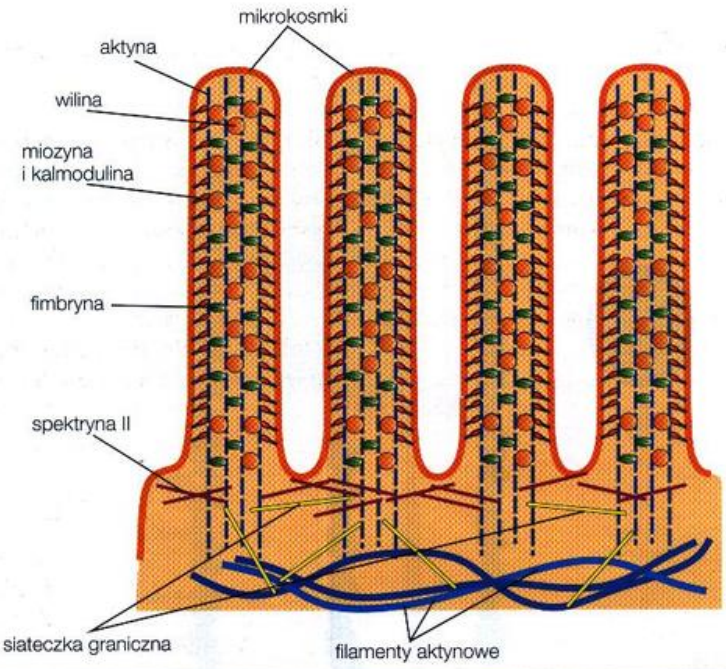
Mikrokosmki występują na wolnej powierzchni wielu komórek nabłonków pokrywających. Są to niewielkie palczaste wypustki cytoplazmy, których obecność zwiększa powierzchnię chłonną komórki. W niektórych przypadkach, gdy wchłanianie jest bardzo intensywne, np. w jelicie cienkim i kanalikach proksymalnych nefronu, mikrokosmki są na tyle liczne, długie i regularne, że można je obserwować w mikroskopie optycznym jako rąbek szczoteczkowy. W innych przypadkach mogą być mniej liczne i mniej regularne. Typowy mikrokosmek ma średnicę 80 nm i długość ok. 1 µm, a jego stabilizację zapewnia rdzeń zbudowany z pęczka 20–30 filamentów aktynowych z ABP, które zapewniają: stabilizację filamentów, połączenie między sobą, z błoną komórkową i z siateczką graniczną oraz ruchomość mikrokosmka. Szczegóły dotyczące struktury mikrokosmka przedstawiono i opisano na rycinie 7.23.

Białka motoryczne związane z aktyną

Dużą rodziną białek motorycznych są miozyny przemieszczające się na filamentach aktynowych. W grupie tej wyróżnia się miozynę mięśniową, czyli miozynę II, oraz miozynę niemięśniową, czyli miozynę I. Oba typy miozyn mogą występować w tych samych komórkach. Różnią się budową i odpowiedzialne są za inny typ ruchu.

Miozyna II jest zbudowana z dwóch głów połączonych z wydłużonym ogonem. Każda głowa zbudowana jest z części globularnej łańcucha ciężkiego miozyny i przyłączonych dwóch łańcuchów lekkich. Ogon jest natomiast superhelisą składającą się z dwóch części wydłużonych łańcuchów ciężkich miozyny. Cała cząsteczka miozyny II ma długość ok. 150 nm. Głowy miozyny mają miejsca do wiązania aktyny i ATP. Hydroliza ATP przez głowy miozyny umożliwia zmianę położenia głów i kroczenie po cząsteczkach aktyny. Podobnie kinezyna i dyneina kroczą po tubulinie mikrotubul. W mięśniach szkieletowych miozyna II polimeryzuje, tworząc miofilamenty grube. Ten typ miozyny jest odpowiedzialny za przesuwanie filamentów aktynowych względem siebie, co jest podstawą przemieszczania się i skurczu komórek.

Miozyna I występuje w komórkach niemięśniowych w różnych izoformach. Składa się z jednej głowy i krótkiego ogona. Głowa miozyny I ma budowę podobną we wszystkich izoformach i wykazuje podobne właściwości jak głowa miozyny II.



Rycina 7.23 Budowa mikrokosmka. Rdzeń mikrokosmka jest utworzony przez równolegle ułożone filamenty aktynowe przymocowane bocznie do błony komórkowej za pomocą miozyny I i kalmoduliny, a między sobą za pomocą wiliny i fimbryny, u podstawy zaś za pomocą spektryny II. Zewnętrzne końce filamentów aktynowych są umocowane do błony komórkowej białkami nukleacyjnymi (bliżej niescharakteryzowanymi), a cytoplazmatyczne zakończenia filamentów aktynowych łączą się z siateczką graniczną zbudowaną także z filamentów aktynowych. Taka budowa mikrokosmków umożliwia im ograniczoną ruchomość polegającą na skracaniu się (zmienione wg Goodmann S.R.).

Ogon jest natomiast krótszy (20–70 nm) i różni się znacznie w poszczególnych izoformach, gdyż każda z izoform łączy się z różnymi obłonionymi strukturami komórki, np. błonami aparatu Golgiego, błonami komórkowymi lub pęcherzykami. Ten typ miozyny jest odpowiedzialny za transport organelli wzdłuż filamentów aktynowych (ryc. 7.24).

Miozyna V jest podobna do miozyny II, ma dwie głowy i ogon będący superhelisą. Głowy miozyny mogą wiązać się z aktyną, jednak końcowa część ogona nie polimeryzuje, lecz wiąże się z białkami obecnymi na błonie pęcherzyków cytoplazmatycznych.

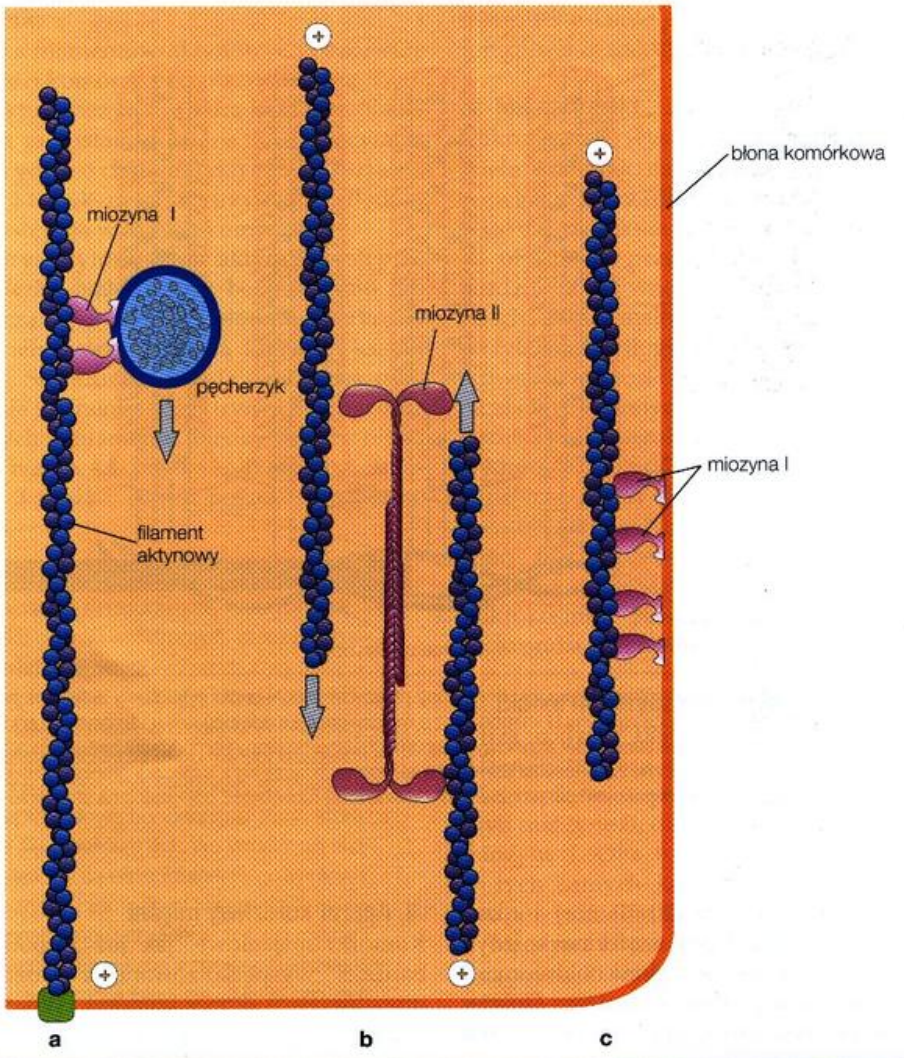
KLINIKA

Izomer miozyna Va łączy się z białkiem Rab27a obecnym na błonie melanosomów. Mutacja genu Rab27a wywołuje **zespół Griscelliego**, rzadkie zaburzenie charakteryzujące się częściowym albinizmem, siwiejącymi włosami, a czasem też zaburzeniami neurologicznymi i niedoborami immunologicznymi.

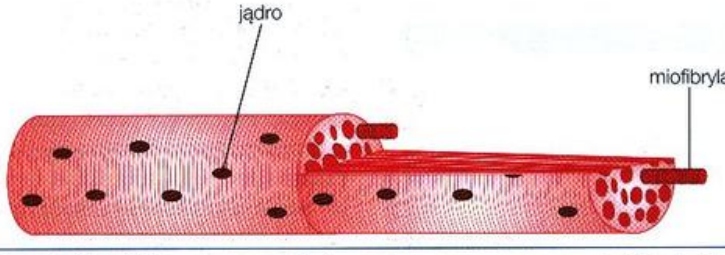
Aparat kurczliwy mięśni

Komórki mięśniowe, jak już wspominano, mają bardziej wyspecjalizowane i złożone systemy umożliwiające skurcz komórek. W systemach tych filamenty aktynowe odgrywają ważną rolę, ale ich funkcja jest możliwa jedynie w całym kompleksie i dlatego przedstawiony tu zostanie cały ten układ. Najpierw opisana zostanie jego budowa i funkcjonowanie w mięśniach poprzecznie prążkowanych, a następnie w mięśniach gładkich.

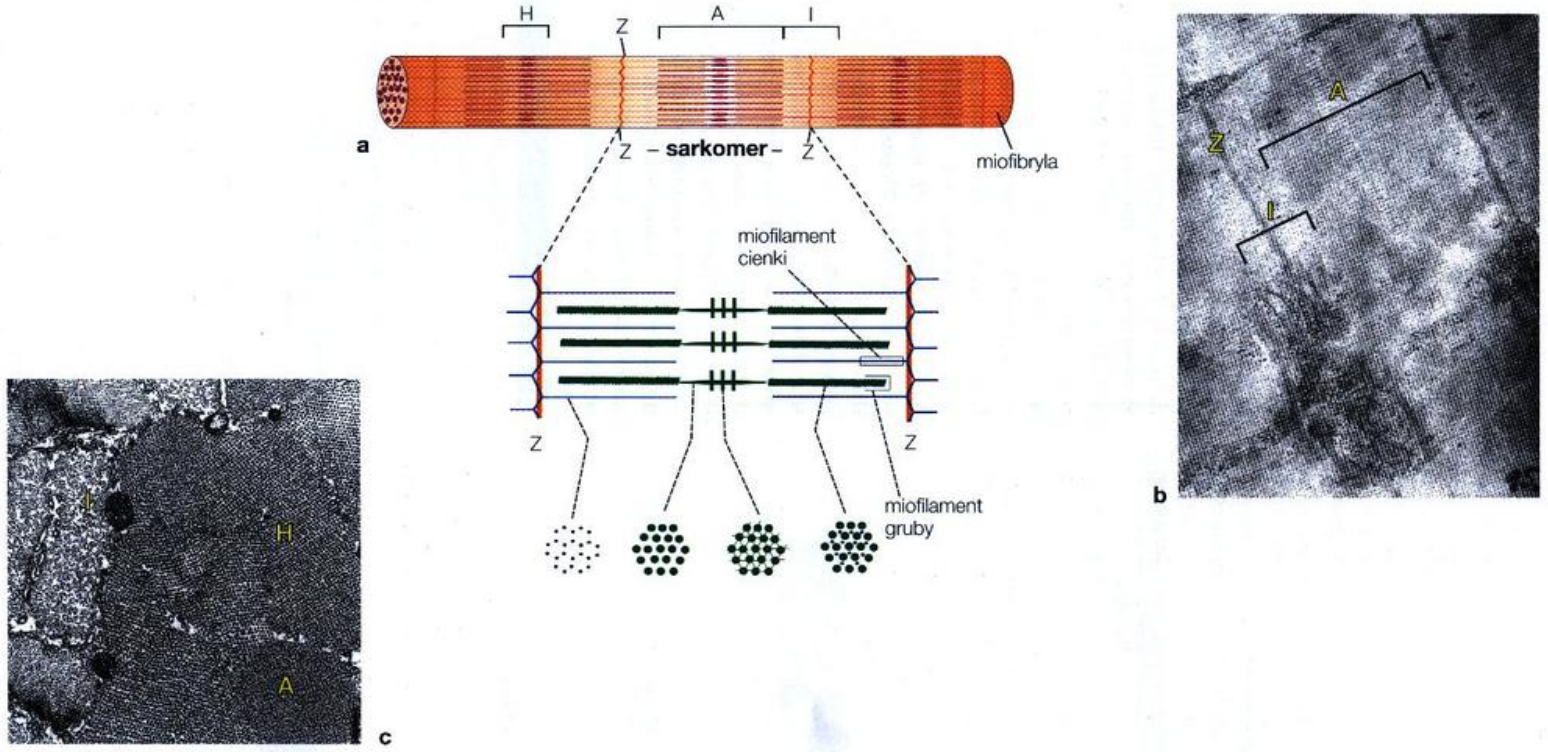
Aparat kurczliwy **w mięśniach poprzecznie prążkowanych** stanowią **miofibryle**, które tworzą pęczki biegnące równolegle do osi długiej włókna, wypełniając prawie całą komórkę. Mają średnicę ok. 1–2 μm (ryc. 7.25). Jednostką strukturalną miofibryli są **sarkomery**. Sarkomer jest to odcinek miofibryli zawarty między dwiema liniami Z. Linia Z przebiega przez środek prążka I. W skład sarkomeru wchodzą więc linia Z, połowa prążka I, prążek A, połowa prążka I i linia Z (ryc. 7.26). W mikroskopie elektronowym w prążku A można zaobserwować jeszcze przejaśnienie, zwane prążkiem H, a w nim linię M. Wszystkie te prążki i linie



Rycina 7.24 Podstawowe funkcje miozyny. W każdym przypadku główki miozyny kroczą w kierunku końca plus filamentu aktynowego: **a.** ogonki miozyny I są przyłączone do pęcherzyka, a główki miozyny I przemieszczają pęcherzyk wzdłuż filamentu aktynowego; **b.** kompleksy miozyny II za pomocą główek przemieszczają przeciwnie zbiegunowane filamenty aktyny względem siebie; **c.** ogonki miozyny I są przymocowane do błony komórkowej, a główki przemieszczają filament aktynowy (wg B. Alberts i wsp.).



Rycina 7.25 Fragment włókna mięśnia szkieletowego w przekroju poprzecznym z zaznaczonymi miofibrylami (wg B. Alberts i wsp.).

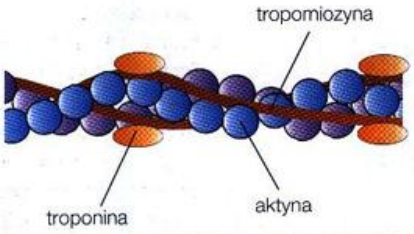


Rycina 7.26 Sarkomer, jednostka budowy miofibryli mięśnia szkieletowego: **a.** schemat pokazujący prążki i linie wchodzące w skład sarkomeru; niżej sarkomer, na którym przedstawiono rozmieszczenie miofilamentów oraz ich ułożenie na przekrojach poprzecznych na różnych poziomach sarkomeru (zmodyfikowane wg Bloom W., Fawcett D.W.); **b.** sarkomer widoczny w mikroskopie elektronowym z wyraźnie widocznymi liniami Z oraz prążkami A i I; **c.** przekrój poprzeczny przez sarkomery pokazujący ułożenie filamentów na wysokości prążków A, I oraz H. Elektronogramy dzięki uprzejmości prof. Renaty Brelińskiej i dr Agnieszki Malińskiej.

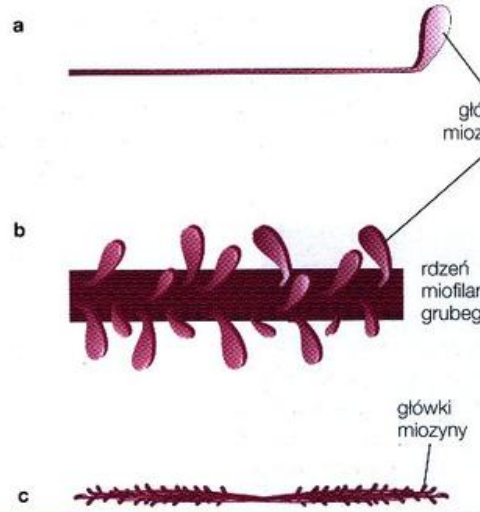
widoczne w mikroskopie świetlnym i elektronowym są wynikiem charakterystycznego ułożenia miofilamentów, czyli włókienek budujących miofibryle. Wyróżnia się dwa rodzaje miofilamentów: cienkie i grube.

Miofilament cienki (ryc. 7.27), zwany aktynowym, ma długość ok. 1 μm i jest zbudowany z trzech białek: aktyny, tropomiozyny i troponiny. Dwie spiralnie skręcone **aktyny** F tworzą rdzeń miofilamentu cienkiego. Na ten aktynowy rdzeń są nawinięte fibryle **tropomiozyny**. W pewnych odstępach jest przyczepiona globularna **troponina** zbudowana z podjednostek C, T i I. Podjednostka C może łączyć się z jonami wapnia, co sprawia, że podjednostki T i I zmieniają położenie tropomiozyny na aktynie. Ma to ważne znaczenie czynnościowe, ponieważ dzięki temu na aktynie zostają odsłonięte miejsca wiążące miozynę.

Miofilament gruby (ryc. 7.28), zwany miozynowym, ma długość ok. 1,5 μm i jest zbudowany z białka fibrylarnego **miozyny** i białka C, które spaja cząsteczki miozyny. Rdzeń miofilamentu grubego składa się ze skręconych łańcuchów ciężkich miozyny, a głowy wystają na zewnątrz tego rdzenia. Każda głowa ma miejsce do wiązania aktyny oraz ATP. Cząsteczki miozyny w miofilamencie grubym są tak ułożone, że głowy znajdują się jedynie na jego końcach.



Rycina 7.27 Schemat budowy molekularnej miofilamentu cienkiego mięśnia szkieletowego.



Rycina 7.28 Schemat budowy molekularnej miofilamentu grubego mięśnia szkieletowego: **a.** cząsteczka miozyny; **b.** fragment miofilamentu grubego; **c.** cały miofilament gruby.

Miofilamenty cienkie występują w prążkach I i A, a grube tylko w prążku A. Miofilamenty cienkie są zakotwiczone w liniach Z. Połączenie to zachodzi dzięki **α-aktyninie** i winkulinie. Miofilamenty grube są także połączone z liniami Z za pomocą bardzo delikatnych włókienek zbudowanych z białka titiny. W mięśniach występują również **filamenty pośrednie desminowe**, które odgrywają bardzo ważną rolę w utrzymaniu spoistości miofibryli i ułożeniu ich względem siebie, za co są odpowiedzialne IFAP – synemina i skelemina. Filamenty desminy oplatają całą miofibrylę, a dodatkowo jeszcze na wysokości linii Z tworzą gęstą sieć, która utrzymuje miofibryle na równej wysokości. Filamenty desminy przyczepiają się także do błony komórkowej za pomocą IFAP – ankyryny i paraneminy. Dlatego też uważa się, że linie Z i utrzymująca je sieć desminowa są odpowiedzialne za automatyczny rozkurcz miofibryli. Każda miofibryla przebiega przez całą długość komórki i zakończona jest na obu końcach liniami Z, które łączą się z integrynami sarkolemy, a te z włóknami kolagenowymi ścięgien. Taki układ połączenia filamentów wewnątrzkomórkowych z włóknami kolagenowymi zapewnia dużą wytrzymałość połączenia mięsień–ścięgno.

KLINIKA

W korze włókna mięśniowego występuje ponadto dystrofina, białko podobne do α-aktyniny i spektryny. Brak dystrofiny uniemożliwia przyczepianie się włókienek desminowych do sarkolemy białka i wywołuje **dystrofię mięśniową Duchenne'a**. Jest to choroba wrodzona występująca u osobników męskich z częstością 1:4000 lub rzadko u kobiet z zespołem Turnera. Polega na degeneracji i martwicy włókien mięśni szkieletowych i zastępowaniu ich przez tkankę tłuszczową lub łączną włóknistą. Choroba ta obejmuje stopniowo kolejne grupy mięśni. Około dwudziestego roku życia występuje całkowita degeneracja mięśni oddechowych i śmierć.

Dla synchronizacji skurczu mięśnia ważne znaczenie ma **triada mięśniowa**. W skład triady wchodzą kanalik T oraz dwie cysterny brzeżne

(ryc. 7.29 a). Kanaliki T są rurkowatymi wpukleniami sarkolemy, które przebiegają poprzecznie w stosunku do miofilamentów na granicy każdego prążka A i I. Utworzona więc zostaje w sarkoplazmie gęsta sieć kanalików, docierająca do każdego sarkomeru. W towarzystwie kanalików T biegną cysterny brzeżne, które są wyspecjalizowaną częścią siateczki sarkoplazmatycznej gładkiej otaczającej każdą miofibrylę. Cysterny brzeżne mają zdolność gromadzenia jonów wapnia dzięki pompie wapniowej wmontowanej w błonę cystern oraz uwalniania jonów wapnia, gdyż w ich błonie znajdują się także **kanały wapniowe** otwierane poprzez depolaryzację błon kanalików T (ryc. 7.29 b).

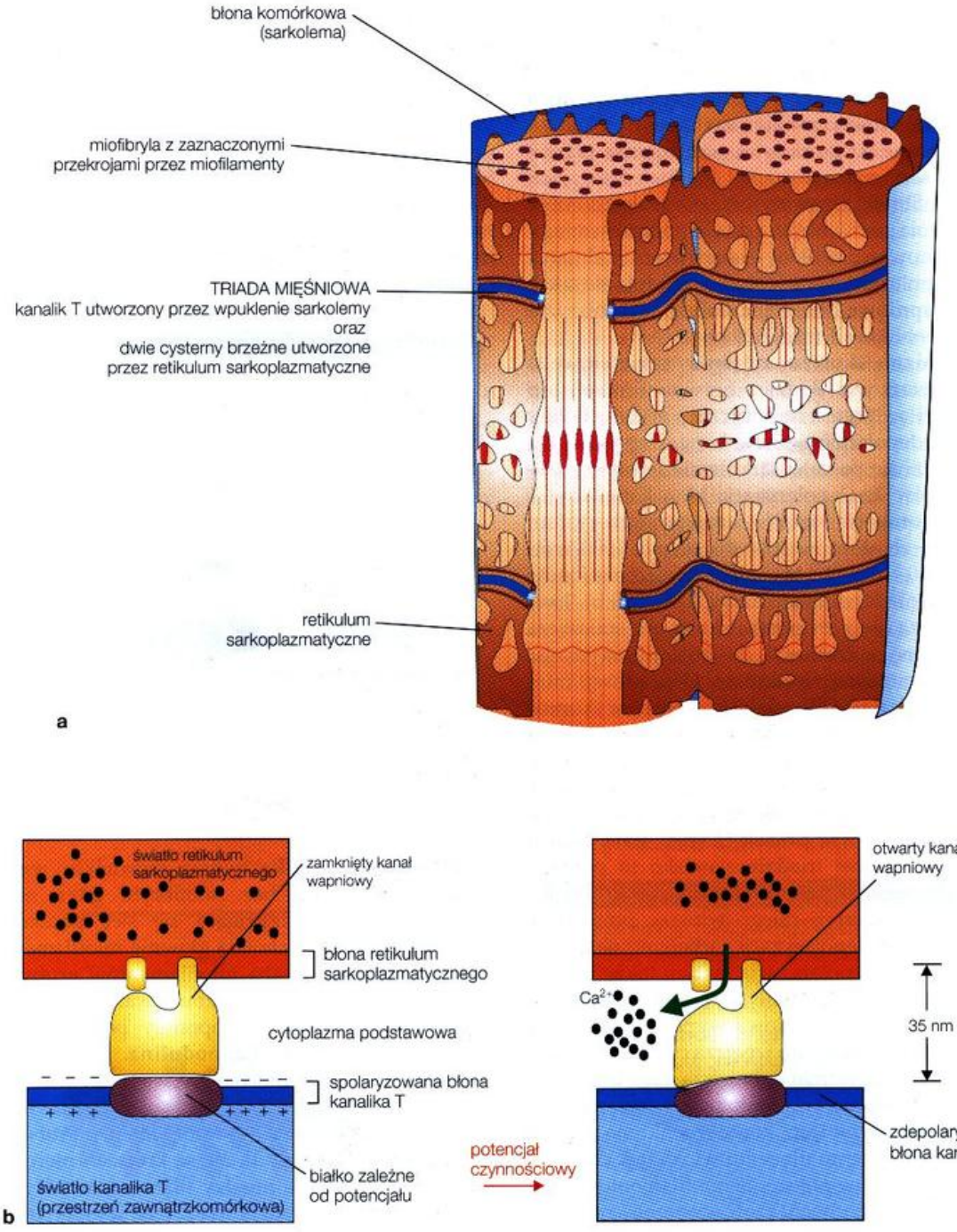
Mechanizm skurczu mięśnia szkieletowego jest wieloetapowy. Bodziec nerwowy w postaci uwolnionej w płytce motorycznej acetylocholiny powoduje depolaryzację sarkolemy. Depolaryzacja ta rozchodzi się po całej sarkolemie i dotyczy także kanalików T. Depolaryzacja błon kanalików T powoduje otwarcie kanałów wapniowych cystern brzeżnych, co doprowadza do ponad 1000-krotnego (od 10^{-8} do 10^{-5} M) wzrostu stężenia jonów wapnia na obszarze cytoplazmy (ryc. 7.29 b). Jony wapnia łączą się z troponiną, która przemieszcza tropomiozynę i dochodzi do odsłonięcia miejsc wiążących miozynę na aktynie. Obie głowy miozyny rozkładają ATP, dzięki czemu wykonują naprzemienne ruchy i głowy miozyny kroczą po aktynie (ryc. 7.30). Miofilamenty cienkie wsuwają się między miofilamenty grube, co powoduje skracanie sarkomerów o ok. 30%; skraca się też lub zanika prążek I oraz prążek H (ryc. 7.31). Dzięki silnie rozgałęzionej triadzie zjawisko to przebiega synchronicznie we wszystkich sarkomerach wszystkich miofibryli całego włókna, powodując jego skurcz. Po depolaryzacji sarkolemy następuje samoczynna jej repolaryzacja, w tym także repolaryzacja kanalików T. Kanały wapniowe zostają zamknięte, a pompa wapniowa wypompowuje jony wapnia z sarkoplazmy do wnętrza cystern. Stężenie jonów w sarkoplazmie zmniejsza się, troponina oddaje jony wapnia, tropomiozyna wraca na swoje miejsce, miozyna traci kontakt z aktyną. Dzięki charakterystycznemu ułożeniu włókienek desminy powraca pierwotne położenie miofilamentów cienkich względem grubych, czyli występuje rozkurcz sarkomerów i całego włókna.

Skurcz komórek mięśnia sercowego przebiega podobnie jak w mięśniu szkieletowym, gdyż organizacja sarkomeru jest taka sama, a triady, choć wykazują niewielkie różnice morfologiczne, mają podobny udział w skurczu. Mięsień sercowy jest zbudowany z komórek, które łączą się za pomocą wstawek w długie szeregi komórek, tworząc włókna. Wstawki są złożonymi połączeniami międzykomórkowymi zapewniającymi odpowiednie połączenie czynnościowe i mechaniczne całego włókna. Wstawkę budują: desmosomy łączące filamenty desminowe komórek, strefy zwierające łączące filamenty aktynowe komórek (podobnie jak linie Z wewnątrz komórek) oraz połączenia typu neksus umożliwiające szybkie przechodzenie potencjału czynnościowego, co zapewnia synchronizację skurczu komórek we włóknie.

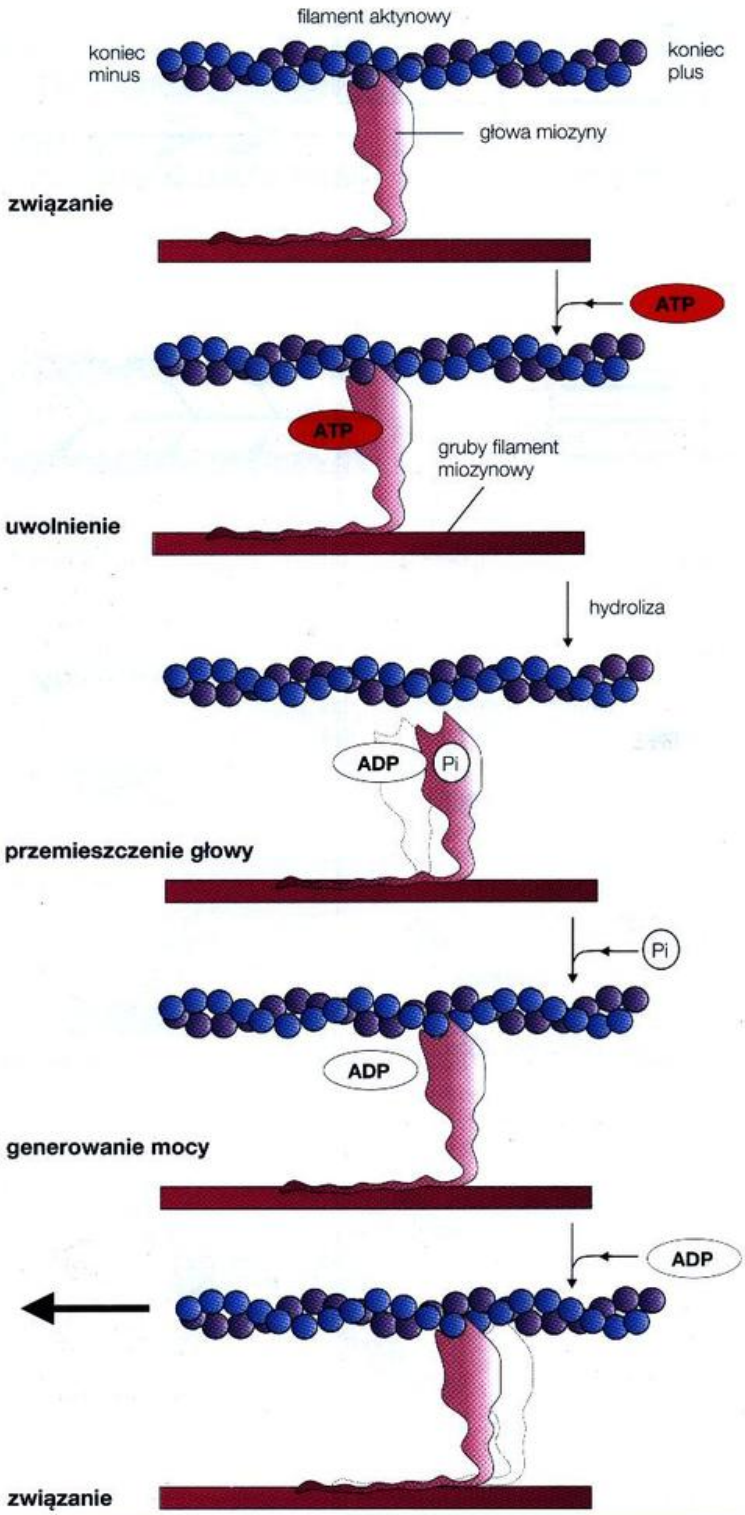
KLINIKA

W komórkach mięśnia sercowego niskie stężenie Ca^{++} jest utrzymywane głównie przez białko błonowe wymiennika Na^+/Ca^{++} na zasadzie antyportu, podczas gdy w innych komórkach głównie dzięki działaniu ATP-zależnej pompy Ca^{++}. Depolaryzacja sarkolemy po pobudzeniu komórki mięśnia sercowego zmienia kierunek transportu Na^+ i Ca^{++}, w sarkoplazmie zwiększa się stężenie Ca^{++}, co prowadzi do dalszego uwalniania wapnia z siateczki sarkoplazmatycznej i wywołania skurczu. Poznanie tego mechanizmu pozwoliło na wytłumaczenie działania **glikozydów nasercowych**, np. digoksygeniny i strofantyny, szeroko stosowanych w niewydolności krążenia spowodowanej niedostateczną siłą skurczową mięśnia sercowego. Glikozydy te hamują pompę Na^+/K^+, co zwiększa stężenie Na^+ w komórkach i zmniejsza gradient Na^+.

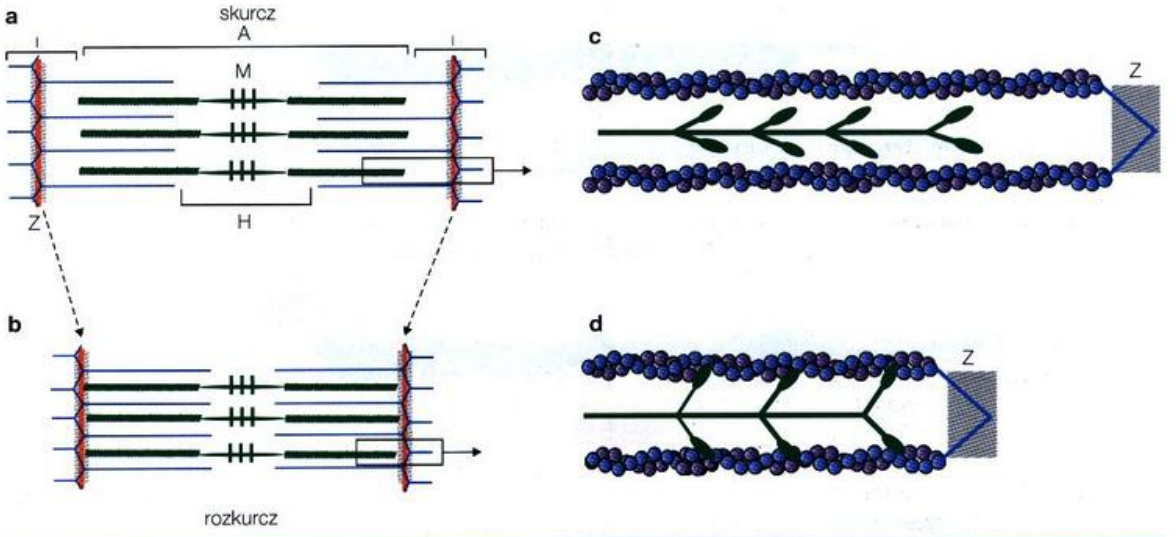
Mięśniówkę gładką tworzą niewielkie, wrzecionowate komórki bez miofibryli, gdyż miofilamenty tworzą krzyżującą się sieć pęczków. W skład pęczków wchodzą głównie miofilamenty cienkie i mniejsza liczba miofilamentów grubych. Miofilamenty cienkie są zbudowane z aktyny i tropomiozyny, a rolę troponiny pełni rozproszona w cytoplazmie **kalmodulina**. Ważną rolę w skurczu mięśni gładkich odgrywa też **kaldesmon** – białko, które wiąże się z aktyną, uniemożliwiając przyłączenie się miozyny. Miofilamenty grube są zbudowane z miozyny II, ale są krótsze i nieregularnie rozmieszczone między filamentami aktyny. Komórki te nie posiadają triad, lecz wyspecjalizowany system błon siateczki sarkoplazmatycznej kontrolujący pod sarkolemą ważny dla skurczu poziom wapnia wewnątrzkomórkowego. Mimo tych różnic, ogólna zasada skurczu jest podobna do skurczu w mięśniach szkieletowych i polega na przesuwaniu się głów miozyny na aktynie. Aby



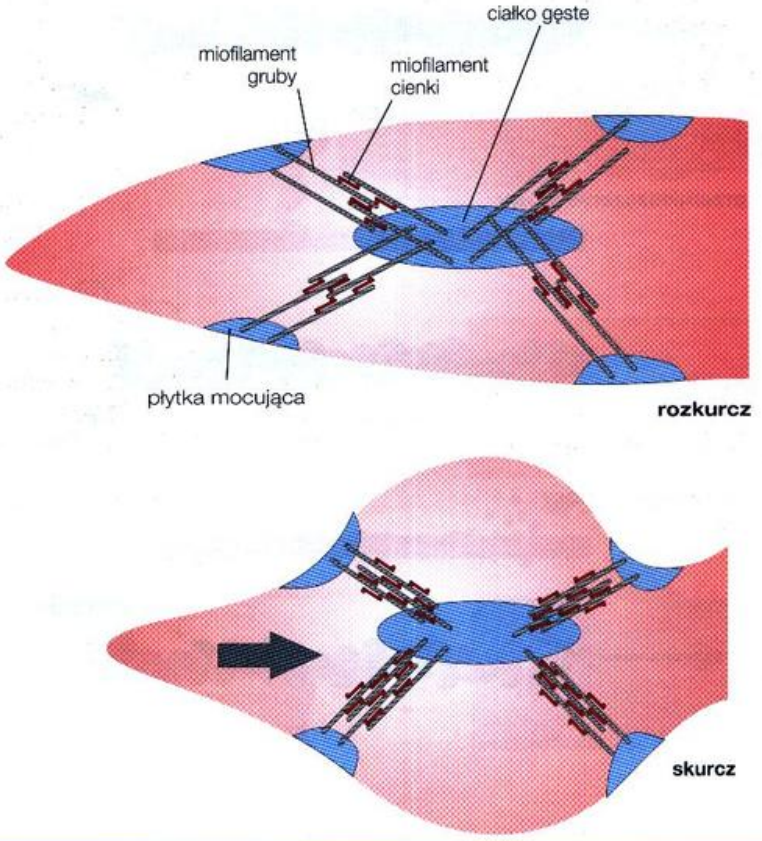
Rycina 7.29 Triada mięśnia szkieletowego: **a**. ogólny widok triad i ich rozmieszczenie w stosunku do miofibryli; **b**. wpływ polaryzacji błony kanalika T na stan kanałów wapniowych siateczki sarkoplazmatycznej (cystern brzeżnych). Jony wapnia zaznaczono jako czarne kuleczki (wg B. Albert i wsp.).



Rycina 7.30 Cykl zmian w głowie miozyny (dla uproszczenia pokazano jedną głowę) umożliwiający przemieszczanie się miozyny po miofilamencie cienkim (aktynowym) (wg B. Alberts i wsp.).



Rycina 7.31 Sarkomer podczas skurczu i rozkurczu: **a** i **b.** skrócenie sarkomeru podczas skurczu; **c** i **d**. usytuowanie główek miozyny w stosunku do aktyny podczas skurczu i rozkurczu.



Rycina 7.32 Mechanizm skurczu komórki mięśniowej gładkiej. Podczas skurczu miofilamenty cienkie, umocowane do ciałek gęstych i płytek mocujących, wsuwają się między siebie dzięki obecności miofilamentów grubych, co prowadzi do zbliżenia się płytek mocujących i skrócenia komórki (zmodyfikowane wg Krstic R.V.).

Tabela 7.7 Porównanie budowy i funkcji ważniejszych białek motorycznych

	Miozyna I	Miozyna II	Miozyna V	Kinezyna	Dyneina (cytoplazmatyczna)
Liczba głów	1	2	2	2	2
Ogon wiąże się do	struktur błoniastych	miozyny II	błony pęcherzyków	błony pęcherzyków	błony pęcherzyków
Głowa wiąże się do	filamentów aktynowych	filamentów aktynowych	mikrotubul	mikrotubul	mikrotubul
Kierunek przemieszczania	koniec plus	koniec plus	koniec plus	koniec plus	koniec minus

zapoczątkować skurcz, muszą być spełnione dwa warunki: musi nastąpić fosforylacja głów miozyny przez kinazę miozynową (fosforylacja ta powoduje zmianę konformacji głów miozyny, co umożliwia jej interakcję z miozyną) oraz jednocześnie musi zostać usunięty kaldesmon, który związany z filamentami aktynowymi blokuje miozynie dostęp do aktyny. Do obu zdarzeń zachodzi w wyniku wzrostu wewnątrzkomórkowego cAMP oraz jonów wapnia aktywujących kalmodulinę. Uwolnienie jonów wapnia z siateczki sarkoplazmatycznej oraz aktywacja cyklazy adenylowej następują pod wpływem neuroprzekaźników z zakończeń nerwowych układu sympatycznego i parasympatycznego lub pod wpływem hormonów. Skurcz mięśni gładkich wywołują m.in.: adrenalina, noradrenalina, angiotensyna, serotonina i oksytocyna. Rozkurcz mięśni gładkich wywołuje natomiast tlenek azotu (NO), który zwiększa stężenie cGMP, co prowadzi do spadku stężenia jonów wapnia.

Cechą charakterystyczną komórek mięśniowych gładkich są **ciałka gęste** występujące w cytoplazmie lub **płytki mocujące** (podobne do ciałek gęstych) przyłączone do sarkolemy. Są one, podobnie jak linie Z w mięśniach poprzecznie prążkowanych, zbudowane z α-aktyniny i są miejscami przyczepiania się filamentów aktynowych i filamentów pośrednich. Ponieważ filamenty aktynowe są przymocowane przeciwbieżnie do błony komórkowej oraz do ciałek gęstych, przesuwanie się miozyny po aktynie przybliża te struktury do siebie, wywołując skracanie się całej komórki (ryc. 7.32).

Piśmiennictwo

Bajer S., Kasprzak A. A.: *Białka śledzące koniec plus mikrotubul oraz ich udział w organizacji wrzeciona mitotycznego.* Post. Bioch. 2009, 55, 223–231.

Cytoszkielet. [w:] *Podstawy biologii komórki* (Alberts B.). Wyd. Nauk. PWN, Warszawa 2005, cz. 2, 573–610.

Cytoszkielet. [w:] *Podstawy molekularne biologii komórki* (Fuller G. M., Shields D.). PZWL, Warszawa 2000, 165–194.

Fletcher D.A., Mullins D.: *Cell mechanics and the cytoskeleton.* Nature 2010, 463, 485–492.

Litwiniec A., Grzanka A., Stępień A.: *Zaburzenia funkcji lamin a patofizjologia laminopatii.* Post. Biol. Kom. 2006, 33, 589–795.

Marszałek A., Błotna-Filipiak B., Witt M., Biczysko W.: *Zespół Kartagenera jako zespół nieruchomych rzęsek – przegląd wiadomości.* Post. Biol. Kom. 1998, 26, 447–460.

Simiczyjew A., Malicka-Błaszkiewicz M., Nowak D.: *Funkcjonalne zróżnicowanie cytoplazmatycznych izoform aktyny.* Post. Bioch, 2013, 59, 285–294.

Wickstead B., Gull K.: *The evolution of the cytoskeleton.* J. Cell Biol. 2011, 194, 513–525.

Zaremba-Czogalla M., Dubińska-Magiera M., Rzepecki R.: *Nowe funkcje lamin – starzy znajomi w nowym świetle.* Post. Biol. Kom. 2010, 37, 505–674.

ROZDZIAŁ 8

Wybrane procesy cytoplazmatyczne

Cezary Wójcik, Stanisław Moskalewski

HASŁA

Adresowanie białek

Procesy prowadzące do dostarczenia białek powstających w cytoplazmie do poszczególnych przedziałów komórkowych, dzięki istnieniu **sekwencji sygnałowych** i/lub **sortujących**.

Białka osadnicze (rezydentne)

Białka specyficzne dla każdego przedziału, mające charakterystyczne sekwencje sortujące lub łączące się ściśle z innymi białkami osadniczymi, posiadającymi takie sekwencje.

Białka opiekuńcze (ang. *chaperones*)

Stabilne białka mające powinowactwo do hydrofobowych sekwencji innych białek, łączące się z nowo powstałymi lub nieprawidłowo sfałdowanymi białkami. Oddziaływanie białek opiekuńczych zapobiega agregacji białek, warunkując ich prawidłowe fałdowanie z udziałem energii pochodzącej z hydrolizy ATP.

Białka płaszcza

Białka, takie jak **klatryna** czy **koatomery**, umożliwiające powstawanie pęcherzyków transportowych poprzez odkształcanie błon.

Degradacja zależna od siateczki śródplazmatycznej (ERAD, ang. *endoplasmic reticulum associated degradation*)

Degradacja nieprawidłowo sfałdowanych białek siateczki śródplazmatycznej, wymagająca retrotranslokacji tych białek przez kanał translokonu do cytoplazmy, gdzie zostają one ubikwitynowane i następnie degradowane przez proteasomy 26S.

Kompleks pora jądrowego (*NPC*, ang. *nuclear pore complex*)

Makromolekularny kompleks wielu białek (**nukleoporyn**), który reguluje transport makrocząsteczek pomiędzy jądrem a cytoplazmą, pozwalając na swobodny przepływ wody, metabolitów i białek o masie do ~60 kDa.

Kompleks TOM/TIM

Kompleks kanałowy zewnętrznej (TOM, ang. *transport through outer membrane*) i wewnętrznej (TIM, ang. *transport through inner membrane*) błony mitochondrialnej. Uczestniczy w imporcie białek z cytoplazmy do macierzy mitochondrium, co następuje poprzez wytworzenie wspólnego kompleksu TIM/TOM, umożliwiającego ominięcie przestrzeni międzybłonowej.

Nukleoferyny

Białka, takie jak **importyny** oraz **eksportyny**, transportujące makrocząsteczki pomiędzy jądrem a cy-

toplazmą poprzez kompleks pora jądrowego. Import danego białka do jądra warunkuje sekwencja **NLS** (ang. *nuclear localization signal*), podczas gdy eksport do cytoplazmy zależy od **NES** (ang. *nuclear export signal*).

Odpowiedź białek rozfałdowanych (UPR, ang. *unfolded protein response*)

Zespół szlaków biochemicznych ulegających aktywacji pod wpływem pojawienia się w świetle siateczki śródplazmatycznej nadmiaru nieprawidłowo sfałdowanych białek. UPR prowadzi do indukcji specyficznych czynników transkrypcyjnych (**XBP1, ATF6**) oraz wstrzymania translacji większości białek zależnej od fosforylacji czynnika inicjacji **eIF2α**. Jeżeli UPR nie jest w stanie skutecznie przeciwdziałać nadmiarowi rozfałdowanych białek, wówczas prowadzi do apoptozy.

Peptydaza sygnałowa

Enzym w przedziale docelowym, odcinający sekwencję sygnałową po spełnieniu przez nią roli adresującej.

Peroksyny

Peroksysomalne białka, tworzące kanały, poprzez które sfałdowane białka dostają się do światła peroksysomów z cytoplazmy.

Proteasomy

Proteasomy są występującymi w jądrze i cytoplazmie organellami niebłoniastymi, odpowiedzialnymi za degradację większości białek w komórce. Wyróżnia się rdzeniowe **proteasomy 20S,** o strukturze pustego w środku cylindra utworzonego przez cztery pierścienie, oraz **proteasomy 26S**, powstałe przez połączenie się proteasomów 20S z dwoma cząstkami aktywatora **PA700**. Te ostatnie odpowiadają za degradację białek wyznakowanych łańcuchem poliubikwityny.

Szlak wydzielania konstytutywnego

Szlak prowadzący do wydzielenia białek na powierzchnię komórki, prowadzący od siateczki śródplazmatycznej poprzez aparat Golgiego do pęcherzyków wydzielniczych, ulegających ciągłej egzocytozie. Nie wymaga specyficznej sekwencji sygnałowej.

Szlak wydzielania regulowanego

Podobnie jak szlak wydzielania konstytutywnego prowadzi z siateczki śródplazmatycznej poprzez aparat Golgiego na powierzchnię komórki. W odróżnieniu od szlaku konstytutywnego wymaga udziału specjalnych pęcherzyków wydzielniczych, których egzocytoza zależy od specyficznych sygnałów. Wymaga obecności sekwencji sortujących.

Translokacja białek do siateczki śródplazmatycznej

Kotranslacyjny import białek do siateczki śródplazmatycznej warunkowany obecnością N-końcowej **sekwencji sygnałowej** rozpoznawanej przez **cząstkę rozpoznającą sygnał** (**SRP**, ang. *signal recognition particle*). Kompleks rodzącego się białka, rybosomu i SRP łączy się z kanałem **translokonu**, poprzez który białko dostaje się do siateczki śródplazmatycznej.

Transport pęcherzykowy

Przemieszczanie się pęcherzyków transportowych pomiędzy poszczególnymi przedziałami szlaku wydzielniczego.

Ubikwitynacja białek

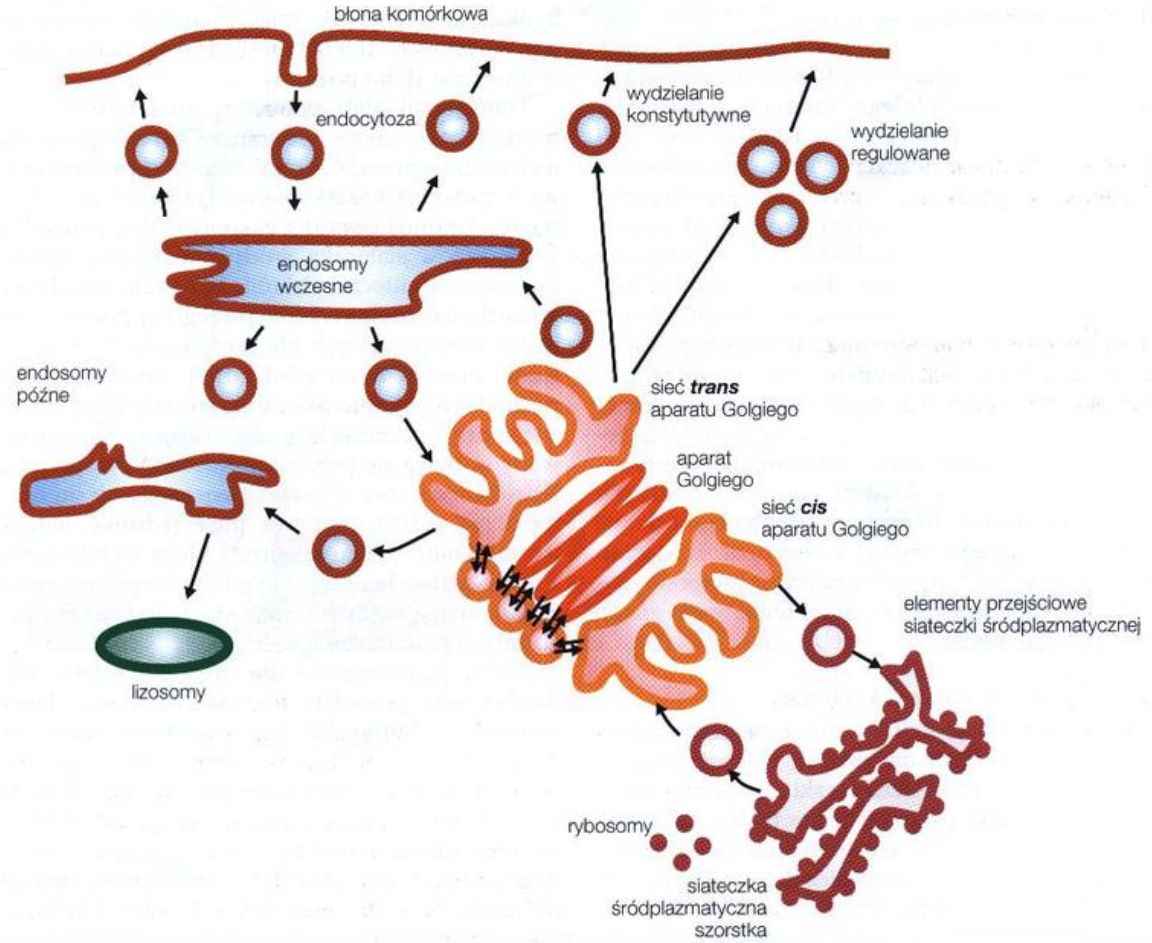
Kowalencyjne przyłączanie do innych białek jednej (**mono-**) lub wielu (**poli-**) cząsteczek drobnego białka **ubikwityny**. Ubikwitynacja spełnia rolę etykiety adresowej uczestniczącej w różnych procesach komórkowych. Jej głównym zadaniem jest wyznakowanie białek, mających ulec degradacji przez **proteasomy**. Ubikwitynacja wymaga kaskady enzymów: enzymu aktywującego ubikwitynę (**E1**), enzymu koniugującego ubikwitynę (**E2**) oraz ligazy ubikwityny (**E3**). Ubikwityna może zostać odłączona od białek pod wpływem **enzymów deubikwitynujących**.

Wprowadzenie

Komórka eukariotyczna podzielona jest za pomocą błon komórkowych na szereg odrębnych obszarów zwanych **przedziałami, kompartmentami** lub **organellami błoniastymi** (w odróżnieniu od organelli nieotoczonych błoną, takich jak centrosomy, rybosomy lub proteasomy). Na organelle błoniaste szlaku wydzielniczego składają się: siateczka śródplazmatyczna gładka i szorstka, aparat Golgiego wraz z sieciami *cis* i *trans*, endosomy i lizosomy. Organelle szlaku wydzielniczego tworzą większą całość, gdyż odbywa się poprzez nie intensywny, wielokierunkowy przepływ błon i ich zawartości (ryc. 8.1). **Mitochondria** i **peroksysomy**, choć także są organellami błoniastymi, stoją niejako na uboczu tego układu, uczestnicząc w mniejszym stopniu w przepływie błon.

Organelle szlaku wydzielniczego oraz otoczka jądrowa powstały w czasie ewolucji na drodze inwaginacji błony komórkowej prakomórki eukariotycznej. Zawartość światła organelli błoniastych odpowiada więc topologicznie środowisku zewnątrzkomórkowemu. Mitochondria pochodzą natomiast od symbiotycznych prokariontów. **Jądro komórkowe** jest oddzielnym przedziałem, jednakże jego zawartość jest topologicznie tożsama z cytoplazmą, z którą ulega wymieszaniu w czasie każdej mitozy.

Organelle błoniaste wraz z jądrem komórkowym zajmują zwykle nieco ponad połowę objętości komórki, podczas gdy jej resztę stanowi **cytosol**. Zarówno mitochondria, jak i siateczka śródplazmatyczna nie mogą powstać *de novo* w komórce pozbawionej tych organelli. W przypadku mitochondriów zależy to od obecności mitochondrial-



Rycina 8.1 Schemat przedstawiający zależności pomiędzy głównymi organellami szlaku wydzielniczego, z zaznaczeniem głównych szlaków transportu pęcherzykowego.

nego DNA. Natomiast w przypadku siateczki śródplazmatycznej uzasadnia się to obecnością odpowiednich białek błonowych, które nie mogą przybrać właściwej konformacji bez obecności preformowanych błon i pomocy białek opiekuńczych już istniejących w obrębie tej organelli. Pozostałe organelle szlaku wydzielniczego, w tym aparat Golgiego, lizosomy i endosomy, a także najprawdopodobniej peroksysomy, mogą wszystkie powstać z siateczki śródplazmatycznej.

Siateczka śródplazmatyczna tworzy gęstą sieć cystern i tubuli, rozciągającą się od obszaru wokół jądra komórkowego na obwód komórki. **Gładka siateczka śródplazmatyczna** jest głównym obszarem produkcji lipidów wchodzących w skład błon, podczas gdy **szorstka siateczka śródplazmatyczna** syntetyzuje białka błon, białka rezydujące w świetle przedziałów błoniastych szlaku wydzielniczego oraz białka przeznaczone na eksport. Błony i ich zawartość przedostają się z siateczki śródplazmatycznej szorstkiej do aparatu Golgiego poprzez specjalny obszar leżący na ich pograniczu, zwany **siecią *cis* aparatu Golgiego**. Aparat Golgiego składa się z kilku do kilkudziesięciu **diktiosomów**, czyli stosów blisko sąsiadujących cystern, obwodowych tubuli i pęcherzyków. Prawidłową przestrzenną organizację aparatu Golgiego zapewniają mikrotubule. W jego obrębie zachodzi m.in. glikozylacja białek oraz ich sortowanie. Błony i białka opuszczają aparat Golgiego poprzez wyspecjalizowany obszar, zwany **siecią *trans* aparatu Golgiego**. Część z nich tworzy ziarna wydzielnicze, które ulegają egzocytozie w procesie **wydzielania regulowanego**, część zaś tworzy pęcherzyki wydzielnicze ulegające **wydzielaniu konstytutywnemu**, część zaś wreszcie wchodzi w skład pęcherzyków łączących się z **endosomami** i **lizosomami**. Błona komórkowa może z kolei ulegać endocytozie i fuzji z układem endosomów. Na każdym z opisanych etapów istnieje ponadto możliwość przepływu wstecznego błon i ich zawartości.

Adresowanie białek w komórce

Cząsteczki rozpuszczalne w tłuszczach dyfundują pomiędzy przedziałami prawie bez ograniczeń. Drobne hydrofilne cząsteczki przemieszczają się wraz z wodą poprzez liczne białka kanałowe obecne w błonach. Dla większych białek i kwasów nukleinowych błony rozgraniczające poszczególne przedziały są jednak barierą trudną do przekroczenia. Z jednej strony zapewnia to istnienie przedziałów zawierających zestawy **białek osadniczych, (rezydentnych)** wyspecjalizowanych w pełnieniu określonych funkcji, z drugiej jednak stwarza problem dostarczania właściwych makromolekuł do stosownych przedziałów z miejsca ich powstania lub modyfikacji.

Poza nielicznymi białkami mitochondrialnymi kodowanymi przez mitochondrialne DNA, wszystkie pozostałe spośród ok. 10 000 rodzajów białek komórkowych powstają w cytosolu. Ażeby opuścić cytosol, białka te muszą posiadać specyficzną **sekwencję sygnałową**, stanowiącą jej adres, a co za tym idzie warunkującą jej dostarczenie do specyficznego miejsca przeznaczenia w komórce. Sekwencja sygnałowa obejmuje zwykle od 15 do 60 reszt aminokwasowych. Występuje ona najczęściej na końcu aminowym łańcucha polipeptydowego, skąd po dotarciu do przedziału docelowego może być usuwana przez specyficzną **peptydazę sygnałową**. Sekwencja sygnałowa może jednak występować w innych regionach białka lub też może mieć charakter motywów strukturalnych. Ten ostatni rodzaj sygnałów adresowych jest słabo poznany.

Transport białek pomiędzy przedziałami komórkowymi można w ogólnym zarysie podzielić na transport **przezbłonowy**, transport **pęcherzykowy** i transport **bramkowany**. Transport przezbłonowy obejmuje import i eksport białek pomiędzy cytosolem a siateczką śródplazmatyczną, peroksysomami i mitochondriami. Pozostałe przedziały komórkowe szlaku wydzielniczego są pozbawione białek transportowych dla syntetyzowanych w cytosolu białek i w związku z tym nabywają białka pochodzące z siateczki śródplazmatycznej drogą transportu pęcherzykowego. Transport bramkowany odbywa się pomiędzy jądrem a cytoplazmą. Jądro komórkowe w czasie interfazy łączy się z cytoplazmą jedynie poprzez **pory jądrowe**, jednak w czasie mitozy jego zawartość ulega wymieszaniu z cytoplazmą. Tego typu przemieszanie zawartości z cytoplazmą nigdy nie zachodzi w przypadku pozostałych przedziałów.

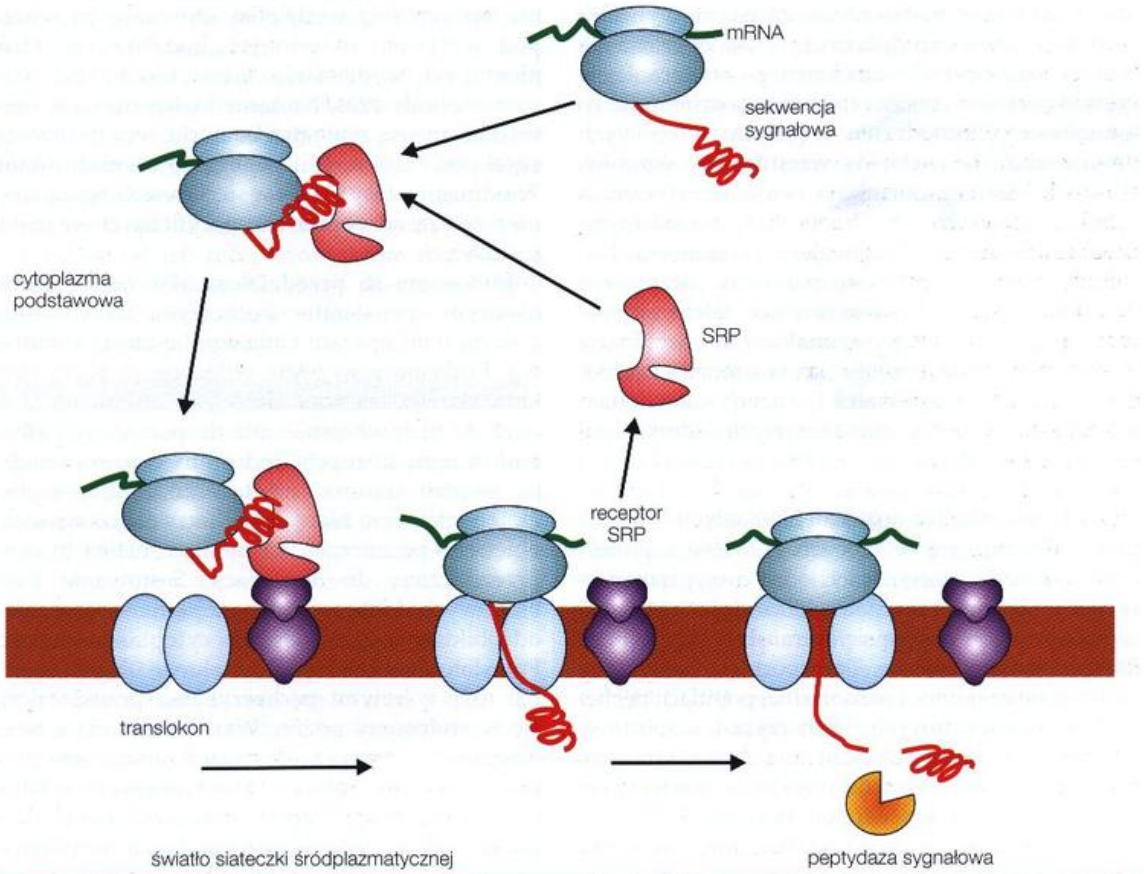
Białka przeznaczone dla organelli szlaku wydzielniczego posiadają peptyd sygnałowy, który warunkuje **kotranslacyjne** przemieszczanie się białka do światła lub w obręb błony siateczki śródplazmatycznej. Białka przeznaczone dla jądra komórkowego, peroksysomów lub mitochondriów są syntetyzowane do końca w cytosolu. Następnie ulegają one transportowi **posttranslacyjnemu** do odpowiednich przedziałów komórkowych, co jest warunkowane obecnością odpowiednich sekwencji sygnałowych.

Translokacja białek do siateczki śródplazmatycznej

Jak już wcześniej zaznaczono, białka występujące w błonach i świetle wszystkich organelli szlaku wydzielniczego, białka błony cytoplazmatycznej i białka wydzielane przez komórkę na zewnątrz muszą najpierw ulec kotranslacyjnemu importowi do szorstkiej siateczki śródplazmatycznej (ryc. 8.2).

Jeżeli wyłaniający się z cytoplazmatycznego rybosomu N-końcowy odcinek łańcucha polipeptydowego zawiera sekwencję sygnałową dla siateczki śródplazmatycznej, to wiąże się ona z **cząstką rozpoznającą sygnał,** czyli **SRP** (ang. *signal recognition particle*). Sekwencja ta nie jest ściśle określona, z reguły zawiera w pobliżu końca aminowego grupę 7–20 aminokwasów hydrofobowych. SRP składa się z sześciu białek oraz małej cząsteczki RNA. Blokuje ona dalsze wydłużanie się łańcucha polipeptydowego do czasu zakotwiczenia kompleksu SRP z rybosomem na błonie siateczki śródplazmatycznej poprzez związany z nią receptor SRP. Hydroliza GTP przez jedną z podjednostek receptora SRP zapewnia energię niezbędną do przekazania kompleksu rybosomu z polipeptydem zawierającym sekwencję sygnałową do **translokonu**, czyli kompleksu białek kanałowych warunkującego przemieszczanie powstającego łańcucha polipeptydowego do światła siateczki śródplazmatycznej. Jednocześnie dochodzi do uwolnienia SRP do cytozolu.

Kanał translokonu bez przyłączonego rybosomu jest zamknięty. Przyłączenie się rybosomu wytwa-



Rycina 8.2 Schemat przedstawiający kotranslacyjną translokację białka do siateczki śródplazmatycznej poprzez kanał translokonu. Sekwencja sygnałowa zostaje rozpoznana przez SRP (ang. *signal recognition particle*), po czym kompleks rybosomu z SRP jest przyłączany do receptora SRP. Następnie rybosom jest przekazywany do translokonu, a SRP ulega odłączeniu. Po ścisłym połączeniu się rybosomu z translokonem sekwencja sygnałowa indukuje otwarcie się kanału translokonu, przez który następuje translokacja powstającego białka do światła lub w obręb błony siateczki śródplazmatycznej szorstkiej. Następnie peptydaza sygnałowa w świetle siateczki śródplazmatycznej usuwa sekwencję sygnałową.

rza szczelne dla wody i jonów połączenie pomiędzy rybosomem a translokonem. Peptyd sygnałowy oddziałuje z hydrofobowymi częściami translokonu, powodując otwarcie kanału. Energia generowana w rybosomie podczas procesu wydłużania łańcucha warunkuje przechodzenie powstającego polipeptydu przez kanał translokonu. Od strony światła siateczki śródplazmatycznej przyłącza się do niego białko opiekuńcze, zwane **BiP** (ang. *binding protein*). BiP dostarcza dalszej energii do przeciągnięcia znajdującego się w kanale translokonu polipeptydu poprzez hydrolizę ATP. **Peptydaza sygnałowa** w świetle siateczki śródplazmatycznej odcina peptyd sygnałowy.

Opisane powyżej etapy procesu translokacji odzwierciedlają przedostawanie się białek luminalnych do siateczki śródplazmatycznej. Translokacja jest bardziej złożona, gdy przedostają się przez translokon białka ulegające wbudowywaniu w błonę siateczki śródplazmatycznej. W czasie ich syntezy dochodzi do wielokrotnego otwierania się i zamykania ścian bocznych kanału translokonu, co umożliwia przechodzenie części hydrofobowych powstającego łańcucha do warstwy fosfolipidów. W czasie syntezy odcinków cytoplazmatycznych białek błonowych, rybosom odłącza się od translokonu, który przejściowo ulega zamknięciu. Następnie rybosom może się ponownie przyłączyć do translokonu. Procesy te również zależą od specyficznych sekwencji sygnałowych wewnątrz łańcucha polipeptydowego, które umożliwiają powstawanie złożonych białek mających kilka domen cytoplazmatycznych rozdzielonych domenami przezbłonowymi.

Sortowanie białek organelli błoniastych

Białka występujące w błonach i świetle organelli szlaku wydzielniczego przechodzą drogą **transportu pęcherzykowego** z siateczki śródplazmatycznej szorstkiej, gdzie dostają się kotranslacyjnie poprzez kompleks translokonu. Transport pęcherzykowy odbywa się za pomocą różnorodnej populacji **pęcherzyków transportowych**. Pęcherzyki transportowe swoiście rozpoznają przedział, do którego zmierzają, i odróżniają go zarówno od przedziału macierzystego, jak i od innych przedziałów komórki.

W przypadku braku dodatkowych sekwencji sortujących białka są transportowane z siateczki śródplazmatycznej **szlakiem wydzielania konstytutywnego** poprzez sieć *cis* aparatu Golgiego, aparat Golgiego, sieć *trans* aparatu Golgiego i pęcherzyki wydzielnicze na powierzchnię komórki. Specyficzne sekwencje sortujące zapewniają obecność w każdym z przedziałów szlaku wydzielniczego wyspecjalizowanych białek **rezydentnych**. Jeżeli nawet przechodzą one do następnego przedziału, są rozpoznawane i zawracane dzięki istnieniu **transportu wstecznego** (zwrotnego). Niektóre białka rezydują w określonych przedziałach, pomimo braku odpowiedniej sekwencji adresowej. Jest to możliwe wówczas, gdy wiążą się one specyficznie z innym białkiem, które ma taką sekwencję. Mechanizm ten dotyczy np. kompleksów enzymatycznych składających się z wielu podjednostek, z których tylko jedna ma sekwencję sortującą.

Nie wszystkie białka docierające do sieci *trans* aparatu Golgiego są kierowane na szlak wydzielania konstytutywnego. Część z nich gromadzi się w obrębie wyspecjalizowanych ziaren wydzielniczych, biorąc udział w **wydzielaniu regulowanym**. Wydzielanie regulowane polega na gromadzeniu specyficznej wydzieliny do czasu jej sekrecji pod wpływem określonych bodźców, w odróżnieniu od wydzielania konstytutywnego, które zachodzi cały czas. Niektóre białka nie są w ogóle wydzielane na zewnątrz komórki, lecz przedostają się z sieci *trans* aparatu Golgiego do **endosomów**. Te odmienne losy białek w sieci *trans* Golgiego również zależą od obecności specyficznych sygnałów sortujących.

Endosomy są przedziałem błonowym wymieniającym nieustannie pęcherzyki transportujące z siecią *trans* aparatu Golgiego i z błoną komórkową. **Endosomy wczesne** położone są bliżej błony komórkowej, tak więc endocytowany materiał dociera do nich wcześniej, niż do położonych głębiej **endosomów** późnych. Endosomy wczesne, wędrując w głąb komórki wzdłuż mikrotubul, wytwarzają wgłębienia błony, przekształcające się w wewnętrzne pęcherzyki, zawierające białka błonowe przeznaczone do degradacji. Sortowanie białek błonowych do wewnętrznych pęcherzyków zależy od ubikwitynacji ich domen cytoplazmatycznych. Powstałe **ciała wielopęcherzykowe** ulegają następnie fuzji z innymi pęcherzykami, przekształcając się w endosomy późne. Warunki panujące w endosomach sprzyjają dysocjacji endocytowanych białek od ich receptorów, które ulegają recyrkulacji na powierzchnię komórki. Endocytowane białka są zazwyczaj przekazywane do endosomów późnych, a następnie do **lizosomów**. Do endosomów wczesnych i późnych nieustannie docierają także pęcherzyki transportowe z sieci *trans* aparatu Golgiego, zawierające m. in. nieaktywne enzymy lizosomalne. Ulegają one akumulacji w endosomach późnych, gdzie są aktywowane.

W tak zwanych **elementach przejściowych** gładkiej siateczki śródplazmatycznej powstają pęcherzyki transportujące materiał do sieci *cis* aparatu Golgiego. Wśród transportowanych białek są też białka osadnicze siateczki śródplazmatycznej. Po rozpoznaniu ich dzięki obecności **sekwencji KDEL** (-Lys-Asp-Glu-Leu-) następuje ich transport zwrotny do siateczki śródplazmatycznej poprzez odmienną populację pęcherzyków transportowych. Pozostałe białka ulegają transportowi pęcherzykowemu do następnych cystern aparatu Golgiego. Transport w poprzek aparatu Golgiego odbywa się poprzez nieustanny ruch olbrzymiej liczby pęcherzyków. Transportowi w kierunku wydzielniczym towarzyszy transport wsteczny. Na każdym odcinku aparatu Golgiego występują specyficzne enzymy osadnicze, warunkujące zachodzenie wielu procesów biochemicznych, takich jak modyfikacja białek polegająca na przyłączaniu i modyfikacji reszt oligosacharydowych.

Jednymi z przyłączanych oligosacharydów są **reszty mannozo-6-fosforanu (M6P).** Białka posiadające M6P są wiązane w sieci *trans* przez specjalne transbłonowe receptory M6P. Powstałe kompleksy są transportowane w pęcherzykach do endosomów. Obniżenie się pH w ich świetle prowadzi do dysocjacji białek od ich receptorów, które recyrkulują do sieci *trans* aparatu Golgiego. Receptory M6P zapewniają adresowanie do lizosomów licznych hydrolaz lizosomalnych.

KLINIKA

Wrodzony brak enzymu odpowiedzialnego za fosforylację mannozy w sieci *cis* aparatu Golgiego prowadzi do rzadkiego zespołu, zwanego **chorobą komórek z ciałkami inkluzyjnymi** (ang. *I-cell disease*). W fibroblastach pochodzących od pacjentów dotkniętych tym schorzeniem enzymy hydrolityczne nie trafiają do lizosomów, lecz są wydzielane do przestrzeni pozakomórkowej szlakiem wydzielania konstytutywnego. Niestrawione substraty hydrolaz lizosomalnych pojawiają się w obrębie cytoplazmy jako ciałka inkluzyjne. Pacjenci dotknięci tą chorobą umierają w dzieciństwie z powodu licznych wad rozwojowych.

Substraty hydrolaz lizosomalnych dostają się do lizosomów kilkoma szlakami. **Endocytoza** prowadzi substancje zewnątrzkomórkowe do endosomów wczesnych, a z nich do endosomów późnych i następnie do lizosomów. Endocytoza może być niespecyficzna (pinocytoza) lub może być **endocytozą zależną od receptorów**. W przypadku gdy endocytoza dotyczy dużych cząstek (np. ciałek apoptotycznych, fragmentów erytrocytów, bakterii itp.), mówi się o **fagocytozie**.

Transport pęcherzykowy

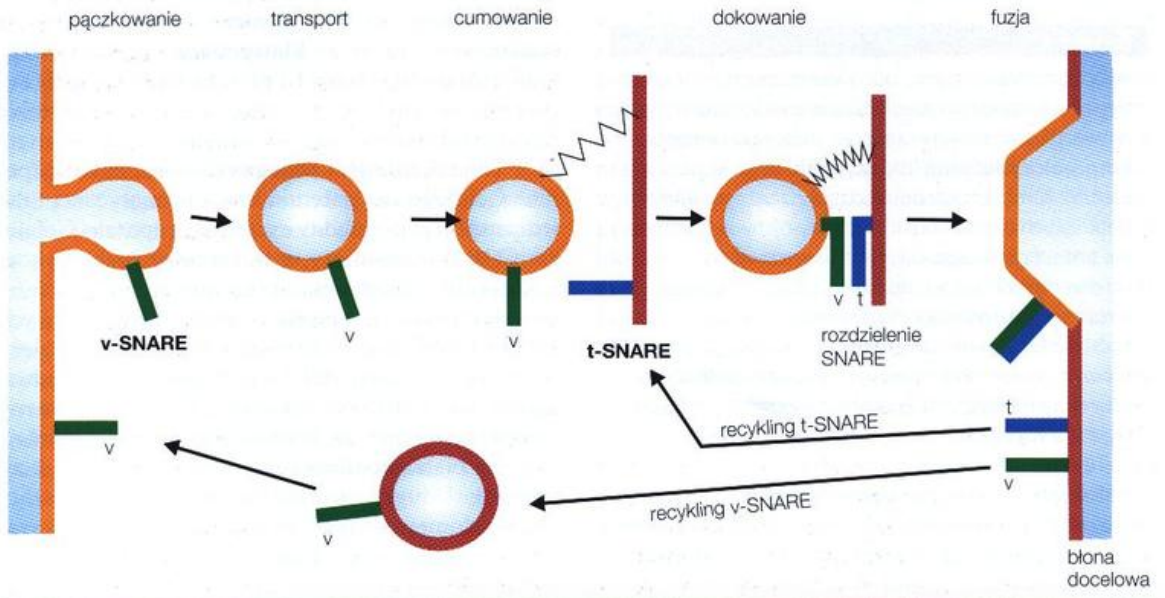
Pomiędzy przedziałami komórkowymi odbywa się nieustanny transport pęcherzykowy. Transportowi w jednym kierunku towarzyszy wsteczny przepływ pęcherzyków zapewniający równowagę zawartości błon w komórce. Błony poszczególnych organelli oraz powstających z nich pęcherzyków transportowych różnią się zawartością lipidów **fosfoinozytolowych**. Fosfolipidy z tej grupy mogą ulegać szybkim przemianom wskutek fosforylacji i defosforylacji reszt 3′, 4′ i 5′ inozytolu, dokonywanych przez kinazy i fosfatazy rezydujące w poszczególnych przedziałach. Błona pęcherzyka zachowuje początkowo charakter przedziału macierzystego. Po fuzji z przedziałem docelowym fosfoinozytydy obecne w błonie pęcherzyka zostają jednak szybko przekształcone w formy charakteryzujące przedział docelowy. Różnorodne białka oddziałujące z pęcherzykami, błonami macierzystymi i błonami docelowymi mają domeny rozpoznające poszczególne rodzaje lipidów fosfoinozytolowych, co zapewnia im specyficzność wiązania.

Pęcherzyki transportowe powstają poprzez inwaginację błon wskutek działania cytoplazmatycznego płaszcza białkowego, oddziałującego ze specyficznymi białkami adaptorowymi i/lub receptorami. Znane są trzy główne rodzaje płaszczów białkowych: płaszcz **klatrynowy**, płaszcz **COP** (ang. *coat protein*) **typu I** i płaszcz **COP typu II**. Pęcherzyki okryte klatryną uczestniczą w endocytozie zależnej od receptorów i wydzielaniu regulowanym. COP I bierze udział w transporcie wstecznym z aparatu Golgiego do siateczki śródplazmatycznej oraz w transporcie pomiędzy cysternami aparatu Golgiego. COP II uczestniczy w transporcie pęcherzyków z siateczki śródplazmatycznej do aparatu Golgiego. Formowanie pęcherzyków transportowych COPI i COPII oraz rekrutacja ich zawartości zależą od białek z **rodziny p24**. Są to białka przezbłonowe, agregujące w złożone hetero-oligomery. Ich domeny cytoplazmatyczne są bardzo podobne, zapewniają łączenie białek koatomerów i montaż płaszcza białkowego. Domeny luminalne białek p24, noszące nazwę domen **GOLD** (ang. *GOLgi Dynamics*), zapewniają rekrutację odmiennych białek ulegających transportowi. Domeny śródbłonowe białek p24 rekrutują niektóre rodzaje lipidów, np. sfingomieliny. Adresowanie pęcherzyków do odpowiedniego przedziału docelowego zapewnia komplementarny

system złożony z omówionych poniżej grup białek – **SNARE** i **Rab**.

Pęcherzyk transportowy powstaje poprzez pączkowanie z przedziału macierzystego, ulega transportowi, następnie cumowaniu, dokowaniu i wreszcie fuzji z przedziałem docelowym (ryc. 8.3). **Pączkowanie** jest wywoływane przez białka płaszcza, odkładające się na obszarach błony, w których skupione są odpowiednie białka adaptorowe, oddziałujące z lipidami fosfoinozytolowymi i/lub receptorami wiążącymi ligandy, które będą zawarte w świetle przyszłego pęcherzyka. Odkładanie się białek płaszcza inicjowane jest przez specyficzne GTP-azy powiązane z GTP, takie jak białka **Arf**. Polimeryzacja białek płaszcza dostarcza siły niezbędnej do odkształcenia błony, wytwarzając **wgłębienie okryte**. Wgłębienie przekształca się w oddzielny pęcherzyk wskutek aktywności wielu białek. Jednym z nich jest **dynamina**, wiążąca się ściśle z fosfoinozytydami błony. Wytwarza pierścień wokół szyjki, łączącej powstający pęcherzyk z błoną macierzystą. Następnie doprowadza ona do jego zwężenia wskutek rozkładu GTP. Po odpączkowaniu pęcherzyka, białka płaszcza oddzielają się od niego wskutek hydrolizy GTP zależnej od białek Arf oraz defosforylacji fosfoinozytydów. Białka płaszcza ulegają ponownemu wykorzystaniu przy wytwarzaniu nowych pęcherzyków.

Pęcherzyki są transportowane (często poprzez oddziaływanie z mikrotubulami) i muszą następnie rozpoznać odpowiedni przedział docelowy. Identyfikację różnych przedziałów docelowych, macierzystych oraz pęcherzyków transportowych zapewniają GTP-azy **Rab**. W komórkach ludzkich występuje około 60 rodzajów białek Rab, które specyficznie znakują różne przedziały komórkowe. Na przykład, Rab2 występuje wyłącznie na powierzchni błon sieci *cis* aparatu Golgiego, Rab 3A charakteryzuje ziarenka wydzielnicze, a Rab 8 wczesne endosomy. Białka Rab w swojej aktywnej postaci związanej z GTP wiążą się z jednej strony z fosfolipidami błon, a z drugiej z cytoplazmatycznymi białkami efektorowymi uczestniczącymi w transporcie pęcherzyków, takimi jak białka motorowe związane z cytoszkieletem. Innymi białkami adaptorowymi Rab są tzw. białka cumujące, tworzące długie włókienka sięgające do 200 nm od błony docelowej w głąb cytoplazmy. Powiązanie się Rab z białkami cumującymi rozpoczyna etap **cumowania** pęcherzyka. Wskutek oddziaływania kolejnych białek cumujących pęcherzyk transportowy przybliża się do błony docelowej, rozpoczynając proces **dokowania** pęcherzyka do błony. Również on jest wyjątkowo swoisty, gdyż uczestniczą w nim dwa białka pasujące do siebie jak klucz i zamek, zwane białkami **SNARE** (ang. *soluble N-ethylmaleimide sensitive factor*



Rycina 8.3 Schemat przedstawiający etapy transportu pęcherzykowego z zaznaczeniem oddziaływania pomiędzy v-SNARE na pęcherzyku transportowym ze swoistym t-SNARE na błonie docelowej. Na schemacie pominięto dodatkowy mechanizm zapewniający specyficzność, zależny od białek Rab i ich receptorów.

attachment protein receptor). Na powierzchni pęcherzyków transportowych występuje pojedynczy helikalny łańcuch polipeptydowy **v-SNARE** (ang. *vesicle*), podczas gdy na powierzchni przedziałów docelowych występuje **t-SNARE** (ang. *target*), składający się z 2–3 helikalnych łańcuchów. W komórkach ludzkich występuje około 35 różnych białek SNARE, charakterystycznych dla błon poszczególnych przedziałów. Dopasowanie do siebie odpowiedniego v-SNARE z t-SNARE powoduje splecenie się domen helikalnych tych białek w stabilną potrójną lub poczwórną helisę. Energia wyzwalana w czasie splatania się tej helisy zbliża do siebie pęcherzyk i błonę docelową, wyciskając spomiędzy błon cząsteczki wody. Fuzja błon następuje wówczas, gdy odległość między nimi zmniejsza się do 1,5 nm. Interakcja białek SNARE wystarcza do procesu fuzji, jednak w różnych rodzajach komórek proces ten jest regulowany poprzez oddziaływanie z białkami, takimi jak Rab. Umożliwia to jego przyspieszenie lub, wręcz odwrotnie, zahamowanie do czasu otrzymania odpowiedniego sygnału, jakim są np. jony wapnia. Ma to istotne znaczenie w przekazywaniu sygnałów przez synapsy lub w czasie degranulacji komórek tucznych. Po zespoleniu się pęcherzyka z błoną docelową białka uczestniczące w procesach cumowania, dokowania i fuzji ulegają odłączeniu i ponownemu wykorzystaniu.

KLINIKA

Toksyny produkowane przez pałeczki tężca i jadu kiełbasianego dostają się do neuronów, gdzie specyficznie powodują częściową proteolizę białek SNARE w terminalach synaptycznych. Uniemożliwia to połączenie się pęcherzyków synaptycznych z błoną presynaptyczną, a co za tym idzie – blokuje transmisję synaptyczną, co często prowadzi do śmierci.

Sortowanie białek w komórkach spolaryzowanych

W spolaryzowanych komórkach nabłonkowych powierzchnia szczytowa komórki (zwrócona do światła narządu) oraz powierzchnia podstawno-boczna (kontaktująca się z sąsiednimi komórkami nabłonka i/lub błoną podstawną) oddzielone są od siebie połączeniami zamykającymi (ang. *tight junctions*) zapobiegającymi przemieszczaniu się pomiędzy nimi makrocząsteczek błonowych. Z tego powodu powierzchnie te mają różny skład białkowy i lipidowy, warunkujący odmienne funkcje. Błona szczytowa jest wzbogacona w glikosfingolipidy, które chronią ją przed uszkodzeniem enzymami trawiennymi lub innymi czynnikami zewnętrznymi. Komórki spolaryzowane posiadają dwa oddzielne przedziały endosomów wczesnych, uczestniczące w ciągłym recyklingu błony z odpowiednich powierzchni, ale jeden wspólny przedział endosomów późnych. Znaczenie adresowania pęcherzyków wydzielniczych do odpowiedniej powierzchni komórki można zrozumieć, rozważając, jakie konsekwencje dla organizmu przyniosłoby wydzielanie kwasu solnego przez komórki okładzinowe żołądka do płynu tkankowego zamiast do światła gruczołów żołądkowych właściwych.

Sortowanie makrocząsteczek na właściwe powierzchnie komórki odbywa się w obrębie sieci *trans* aparatu Golgiego. Białka błonowe przeznaczone na powierzchnię szczytową są często związane z **glikozylofosfatydyloinozytolem (GPI)**, zakotwiczającym je w błonie. Białka z GPI gromadzą się w regionach błony sieci *trans* aparatu Golgiego wzbogaconej w glikosfingolipidy i cholesterol, nazywanych **tratwami lipidowymi** (ang. *lipid rafts*). W tratwach występują także lektyny wiążące białka luminalne zawierające swoiste reszty oligosacharydów. Tratwy lipidowe ulegają egzocytozie na powierzchnię komórki, gdzie uczestniczą w transporcie niektórych substancji do komórki. W obrębie tratew powstają jamki (ang. *caveolae*) zawierające skupienia receptorów związanych przez ligand (np. kwas foliowy), co ułatwia transport do komórki.

Białka przeznaczone wyłącznie dla powierzchni podstawno-bocznej zawierają słabo poznane motywy strukturalne w obrębie części cytoplazmatycznych. Pęcherzyki przeznaczone na powierzchnię podstawno-boczną lub na powierzchnię szczytową zawierają odmienne zestawy białek Rab oraz v-SNARE. Również odmienne są białka t-SNARE występujące na obydwu błonach docelowych. Istnieją także mechanizmy endocytozy białek błonowych, które znalazły się na niewłaściwej powierzchni, warunkujące ich dostarczanie na przeciwległą powierzchnię drogą **transcytozy**.

Import białek do peroksysomów

Peroksysomy są otoczonymi pojedynczą błoną organellami powstającymi głównie poprzez podział poprzednio istniejących peroksysomów, choć mogą one też powstawać *de novo* z siateczki śródplazmatycznej. Białka peroksysomalne są importowane z cytosolu. Większość z nich ma C-końcową **peroksysomalną sekwencję sygnałową 1**, czyli **PTS1** (ang. *peroxisomal targeting sequence 1*), składającą się jedynie z trzech aminokwasów: seryny, lizyny

i leucyny. PTS1 wiąże się z **peroksyną 5** na błonie peroksysomalnej. Niektóre białka posiadają odmienną, N-końcową sekwencję **PTS2**, która jest rozpoznawana przez **peroksynę 7**. Peroksyny 5 lub 7 tworzą wraz z innymi rodzajami peroksyn makromolekularny kompleks translokujący białka do macierzy peroksysomów z użyciem energii otrzymywanej z hydrolizy ATP. W odróżnieniu od białek ulegających importowi do mitochondriów, białka importowane do peroksysomów są w pełni sfałdowane. Białka ulegające wbudowaniu do błony peroksysomalnej mają słabiej poznane błonowe sekwencje sortujące.

KLINIKA

Mutacje poszczególnych genów dla peroksyn, zaburzające import białek do peroksysomów, prowadzą do zespołów wad wrodzonych – zespołu Zellwegera, zespołu Refsuma, adrenoleukodystrofii oraz chondrodysplazji. Noworodki z **zespołem Zellwegera** spowodowanym mutacją genu dla peroksyny 2 mają ciężkie wady mózgu, drobnoguzkową marskość wątroby i niewydolność nerek, prowadzące do ich śmierci. Zdjęcia z mikroskopu elektronowego ukazują w komórkach pacjentów z tym zespołem peroksysomy pozbawione charakterystycznej macierzy.

Import białek do mitochondriów

Struktura i funkcja mitochondriów zostały dokładnie opisane w rozdziale 9. Mitochondria zawierają swój własny genom oraz zestaw rybosomów i tRNA, jednak tylko ok. 5% białek mitochondriów powstaje na obszarze macierzy mitochondrialnej. Pozostałe białka są syntetyzowane w cytoplazmie, skąd muszą zostać importowane. Zewnętrzna błona mitochondrialna, choć przepuszczalna dla wody i jonów, jest zupełnie nieprzepuszczalna dla białek, podczas gdy wewnętrzna błona mitochondrialna jest nieprzepuszczalna także dla jonów, gdyż w poprzek niej występuje gradient elektrochemiczny ($\Delta\psi$) niezbędny w procesie wytwarzania ATP drogą fosforylacji oksydatywnej.

Białka mitochondrialne są syntetyzowane w cytosolu jako białka prekursorowe posiadające mitochondrialną sekwencję sygnałową, czyli **MTS** (ang. *mitochondrial targeting sequence*). Aminoterminalna MTS tworzy α-helisę, w obrębie której aminokwasy zasadowe ustawiają się po jednej stronie, podczas gdy aminokwasy niepolarne po drugiej. Powstające w cytosolu białka mitochondrialne utrzymywane są w stanie niesfałdowanym przez oddziaływanie z białkami opiekuńczymi, w tym ze specjalnym **czynnikiem stymulującym import do mitochondriów,** czyli **MSF** (ang. *mitochondrial import stimulating factor*), który rozpoznaje MTS.

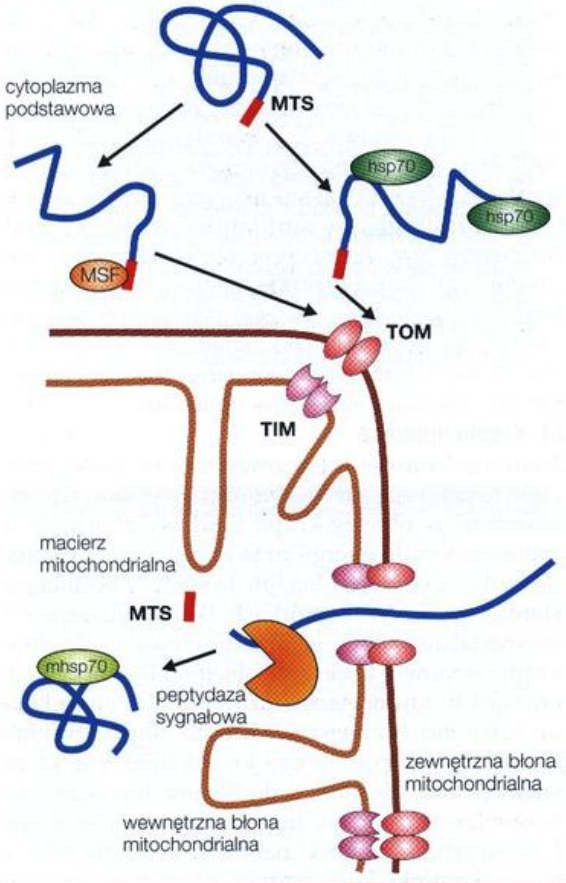
Transport importowanych białek poprzez zewnętrzną błonę mitochondrialną zapewnia kompleks białek **TOM** (ang. *transport across the outermembrane*). Po związaniu importowanego białka cytosolowe białka opiekuńcze ulegają oddzieleniu, a niesfałdowane białko mitochondrialne jest przekazywane do kompleksu kanałowego TOM (ryc. 8.4). Następny etap importu do macierzy mitochondriów polega na zbliżeniu się kompleksu białka kanałowego TOM zewnętrznej błony mitochondrialnej z podobnym kompleksem białek występującym w wewnętrznej błonie mitochondrialnej, zwanym **kompleksem TIM** (ang. *transport across the inner membrane*), co pociąga za sobą zbliżenie się do siebie obydwu błon. Z kanałami TIM od strony macierzy związane jest mitochondrialne białko opiekuńcze, dostarczające energii poprzez hydrolizę ATP, oraz peptydaza sygnałowa. Jeden ze składników kanału TIM posiada hydrofobową helisę ulegającą wbudowaniu w zewnętrzną błonę mitochondrialną, co sprzyja ściślejszemu zbliżeniu się obydwu błon. Początkowy odcinek białka importowanego dostaje się do macierzy wskutek energii przejścia dodatnio naładowanej MTS zgodnie z gradientem elektrochemicznym ($\Delta\psi$, dodatnia przestrzeń międzybłonowa, ujemna macierz). Pozostała część łańcucha polipeptydowego jest przeciągana do macierzy mitochondrialnej w poprzek kanałów TOM/TIM dzięki energii pochodzącej z hydrolizy ATP. Mitochondrialna peptydaza sygnałowa odcina helisę MTS.

Opisany powyżej proces kończy się umieszczeniem importowanego białka w macierzy mitochondrialnej, jednak część białek mitochondrialnych musi ulec zakotwiczeniu w wewnętrznej błonie mitochondrium lub też ulec eksportowi do przestrzeni międzybłonowej. Białka te zawierają dodatkowe tzw. **sekwencje sortujące**. W procesach re-eksportu do przestrzeni międzybłonowej uczestniczą dodatkowe białka kanałowe.

Poza klasycznym szlakiem importu białek do mitochondriów z cytoplazmy, część białek związana z metabolizmem lipidów dostaje się do mitochondriów razem z lipidami z siateczki śródplazmatycznej gładkiej. Transport ten odbywa się z udziałem błon **MAM,** czyli związanych z mitochondriami błon podobnych do siateczki śródplazmatycznej (ang. *mitochondrion-associated ER-like membranes*).

KLINIKA

Hiperoksaluria typu I jest to recesywna choroba uwarunkowana błędnym adresowaniem aminotransferazy alaninowo-glioksalowej (AGT). AGT jest dimerycznym enzymem występującym w peroksysomach hepatocytów, uczestniczącym w metabolizmie kwasu szczawiowego. Wskutek powstania pojedynczej mutacji AGT ulega mylnemu importowi do mitochondriów, gdzie nie jest funkcjonalna. Wskutek tego defektu już w pierwszym roku życia u pacjentów z hiperoksalurią typu I powstają szczawianowe kamienie nerkowe oraz zwapnienia w miąższu nerek. Przez następne lata życia pacjenci ci cierpią na ataki kolki nerkowej oraz częsty krwiomocz, co doprowadza do niewydolności nerek przed 20 rokiem życia.



Rycina 8.4 Schemat przedstawiający import białek posiadających sekwencję MTS do mitochondriów z udziałem kanału TIM/TOM. Importowane białko wiąże się z białkami opiekuńczymi MSF lub hsp70, które przekazują je do kompleksu TOM na zewnętrznej błonie mitochondrialnej. Następnie dochodzi do zbliżenia wewnętrznej błony mitochondrialnej zawierającej kompleks TIM do kompleksu TOM w zewnętrznej błonie mitochondrialnej i utworzenia wspólnego kanału, poprzez który importowany polipeptyd dostaje się do macierzy mitochondrialnej. W macierzy peptydaza sygnałowa odcina MTS, zaś białka opiekuńcze mhsp70 pomagają uzyskać właściwą konformację przestrzenną zaimportowanego polipeptydu.

Transport jądrowo-cytoplazmatyczny

Pomiędzy jądrem a cytoplazmą zachodzi dwukierunkowa wymiana makrocząsteczek, sięgająca miliona makrocząsteczek na minutę. Do jądra są wybiórczo kierowane białka, takie jak histony, polimerazy DNA i RNA lub białka rybosomów, podczas gdy z jądra do cytoplazmy są transportowane gotowe rybosomy, mRNA, tRNA oraz białka cytoplazmatyczne znajdujące się w obrębie jądra odtworzonego po mitozie. Nasilenie tego ruchu odzwierciedla się liczbą porów jądrowych w otoczce jądrowej. W przeciętnej komórce naszego organizmu otoczka jądrowa zawiera od 3000 do 5000 porów.

Bramkę pomiędzy jądrem a cytoplazmą tworzą **kompleksy pora jądrowego,** czyli **NPC** (ang. *nuclear pore complex*). NPC zbudowane są z ok. 30 różnych białek, zwanych **nukleoporynami.** Układają się one w złożony oktagonalny kompleks o masie sięgającej 125 MDa, który zakotwiczony jest w błonie otoczki jądrowej. NPC ulegają rozpadowi w czasie mitozy, a następnie są rekonstruowane na początku interfazy. Jednakże w komórkach terminalnie zróżnicowanych, niepodlegających podziałom, takich jak np. większość neuronów, pory jądrowe są strukturami bardzo statycznymi. Nukleoporyny, podobnie jak inne białka, mogą akumulować uszkodzenia wskutek procesów oksydacyjnych. Ponieważ nukleoporyny tworzące szkielet NPC nie podlegają wymianie, może to prowadzić do rozszczelnienia porów jądrowych oraz do upośledzenia transportu jądrowo-cytoplazmatycznego. Przypuszcza się, że stanowi to jedną z przyczyn starzenia się komórek niepodlegających mitozie.

NPC umożliwiają swobodny przepływ wody, metabolitów, jonów i małych białek o masie cząsteczkowej do około 60 kDa. Dla większych makrocząsteczek transport poprzez NPC jest możliwy jedynie, jeżeli posiadają one specyficzne sekwencje sygnałowe. **Jądrowa sekwencja lokalizacyjna,** czyli **NLS** (ang. *nuclear localization signal*) jest dość zmienna, charakteryzuje się zawartością zasadowych reszt aminokwasowych, takich jak arginina

czy lizyna. Białka, które ulegają reeksportowi z jądra do cytoplazmy, posiadają z kolei **jądrowy sygnał eksportowy,** czyli **NES** (ang. *nuclear export signal*), składający się z sekwencji bogatej w leucynę. Dostawszy się na obszar jądra, białka ulegają rozdzieleniu pomiędzy poszczególne struktury jądrowe, takie jak jąderka, ciałka jądrowe, macierz jądrową lub nukleoplazmę. Jąderkowe sekwencje sygnałowe, czyli **NOS** (ang. *nucleolar targeting signal*), są dłuższe od NLS.

Import i eksport białek poprzez por jądrowy odbywa się na zasadzie wiązania białka zawierającego NLS lub NES z odpowiednimi receptorami, translokacji wzdłuż ok. 200 nm drogi poprzez NPC i następnie uwolnienia na przeciwległym końcu. Często w transporcie uczestniczy dodatkowe białko adaptorowe, pośredniczące w oddziaływaniu receptora z białkiem transportowanym. Cytoplazmatyczne **importyny** rozpoznają i wiążą się z NLS, po czym tak powstały kompleks oddziałuje z **sekwencjami FG** (nazwane tak od zawartości reszt fenyloalaniny i glicyny) na włókienkach cytoplazmatycznych NPC. Podobne sekwencje FG występują na powierzchni nukleoporyny skierowanej do światła pora jądrowego. Kompleks importyny z białkiem transportowanym przyłącza się i odłącza od sekwencji FG, przesuwając się do wnętrza jądra komórkowego, gdzie ulega dysocjacji. Podobnie przebiega eksport białek posiadających NES do cytoplazmy. Są one rozpoznawane przez swoiste białka, zwane eksportynami, z którymi tworzą kompleks, który następnie oddziałuje z sekwencjami FG. Importyny i eksportyny są łącznie zwane **karioferynami,** czyli jądrowymi białkami przenośnikowymi. Energię niezbędną do transportu poprzez NPC dostarcza GTP-aza, zwana **Ran**. Występuje ona w dwóch odmiennych konformacjach w zależności od tego, czy złączona jest z GTP czy z GDP. Hydroliza GTP przekształcająca Ran-GTP w Ran-GDP następuje w cytozolu. Dysocjacja GDP i przyłączenie nowej cząsteczki GTP, czyli przekształcenie Ran-GDP z powrotem w Ran-GTP, następuje w jądrze komórkowym. Przyłączenie się Ran-GTP do kompleksu importyny z białkiem importowanym powoduje jego dysocjację, podczas gdy przyłączenie się Ran-GTP do eksportyny stymuluje powstanie kompleksu z białkiem eksportowanym. Ran-GTP powraca do cytoplazmy, gdzie następuje hydroliza GTP, co z kolei uwalnia białka eksportowane z kompleksu z eksportyną.

KLINIKA

Mechanizmy importu i eksportu białek oraz RNA do jądra komórkowego są wykorzystywane przez niektóre wirusy, np. wirus **HIV** wywołujący AIDS. Po dostaniu się do cytoplazmy RNA wirusa ulega odwrotnej transkrypcji, a powstałe DNA jest zwane **prowirusem**. Ażeby dostać się do jądra komórkowego, prowirusy wymagają rozpadu otoczki jądrowej (a więc mitozy), gdyż kompleks pora jądrowego jest dla nich barierą nie do przebycia. HIV jednak zakaża także komórki nieulegające podziałom, takie jak makrofagi, komórki dendrytyczne, spoczynkowe limfocyty T i neurony. Białko **Vpr** wirusa HIV zapewnia import prowirusa do jądra komórkowego bez rozpadu otoczki jądrowej. Vpr jest adaptorem wiążącym komórkową importynę z DNA prowirusa. Gdy prowirus znajdzie się już w jądrze komórkowym, integruje się z genomem gospodarza, po czym rozpoczyna się transkrypcja wirusowego RNA. Część tego RNA zostaje pocięta, poskładana i wyeksportowana, podobnie jak mRNA komórkowe, część jednak musi wydostać się w postaci niezłożonej i niepociętej, ażeby ulec upakowaniu w nowe wiriony. Zapewnia to białko **Rev**, które jest adaptorem pomiędzy niepociętym RNA wirusa a jedną z eksportyn.

Krople lipidowe

Nadmiar kwasów tłuszczowych oraz steroli przechowywany jest przez komórki w postaci zestryfikowanej w obrębie kropli lipidowych. Krople te stanowią źródło energii oraz budulca potrzebnego do budowy nowych błon lub do syntezy hormonów steroidowych. W komórkach tkanki tłuszczowej, wyspecjalizowanych w przechowywaniu lipidów, krople stanowią większość objętości komórki. Podczas gdy w adipocytach brązowych występuje kilka do kilkunastu mniejszych kropli, adipocyty białe są wypełnione pojedynczą kroplą lipidową, której średnica może dochodzić do 100 μm. Inne komórki, w obrębie których występują znaczne ilości kropli lipidowych, to komórki nabłonka gruczołu mlekowego, komórki kory nadnerczy, enterocyty oraz hepatocyty.

Krople lipidowe nie są statycznymi wtrętami, za które je kiedyś uważano, lecz dynamicznymi organellami, ulegającymi ciągłym przemianom. Powstają w obrębie gładkiej siateczki śródplazmatycznej, gdzie występują esterazy kwasów tłuszczowych i cholesterolu. W odróżnieniu jednak od innych pochodnych siateczki śródplazmatycznej, takich jak peroksysomy, krople lipidowe nie są otoczone błoną komórkową. Ich rdzeń stanowią

obojętne tłuszcze. Zewnętrzna powierzchnia kropli utworzona jest przez pojedynczą warstwę fosfolipidów, wśród których przeważa fosfatydylocholina. Grupy polarne fosfolipidów skierowane są do cytosolu, gdzie oddziałują ze specyficznymi białkami. Ponadto ich ładunek zapewnia odpychanie pomiędzy pojedynczymi kroplami lipidowymi, zapobiegając ich połączeniu się w jedną, wielką kroplę.

W warunkach nadmiaru kwasów tłuszczowych krople lipidowe ulegają szybkiemu wzrostowi, dzięki aktywności esteraz związanych z ich powierzchnią. W warunkach wymagających uwolnienia energii zawartej w kroplach tłuszczowych, aktywacji ulegają lipazy związane z ich powierzchnią, degradujące trójglicerydy do kwasów tłuszczowych i glicerolu. Alternatywną metodę uwolnienia kwasów tłuszczowych zapewnia fagocytoza mniejszych kropli lipidowych. Rozmiar kropel lipidowych kontrolowany jest przez rodzinę **białek PAT** (ang. *perilipin, adipophilin and tail-interacting protein*), do której należą **adipofilina** oraz **perilipina**. Podczas gdy adipofilina uczestniczy we wczesnych etapach powstawania i wzrostu kropli lipidowych, perilipina przyłącza się do większych, bardziej dojrzałych kropli. Białka PAT kontrolują aktywność związanych z kroplą enzymów, takich jak lipazy i esterazy. Oddziałują one także z elementami cytoszkieletu.

KLINIKA

Zaburzenia związane z metabolizmem kropli tłuszczowych stanowią podstawę wielu chorób. Niedobór kropli tłuszczowych charakteryzuje stany niedożywienia, kacheksji oraz lipodystrofii. Z kolei nadmierne odżywianie się prowadzi do hipertrofii i hiperplazji białej tkanki tłuszczowej, charakterystycznej dla otyłości. Przekroczenie zdolności adipocytów do gromadzenia tłuszczów powoduje nadmierne odkładanie się kropli tłuszczowych w innych rodzajach komórek. Akumulacja kropli tłuszczowych w obrębie hepatocytów prowadzi do stłuszczenia wątroby, z czasem powodującego jej marskość. Akumulacja kropli tłuszczowych w obrębie kardiomiocytów prowadzi do niewydolności mięśnia sercowego. Odkładanie kropli tłuszczowych bogatych w estry cholesterolu w obrębie makrofagów błony wewnętrznej tętnic wieńcowych powoduje ich uszkodzenie związane z uwolnieniem mediatorów zapalnych. Prowadzi to do wytworzenia się niestabilnej płytki miażdżycowej, której pęknięcie może powodować całkowite zamknięcie światła tętnicy wieńcowej, prowadząc w konsekwencji do zawału serca.

Białka opiekuńcze

Każde nowo powstające białko wymaga odpowiedniego sfałdowania łańcucha polipeptydowego. Dotyczy to zarówno białek syntetyzowanych w cytosolu, jak i białek ulegających translokacji do światła siateczki śródplazmatycznej lub też białek powstających w macierzy mitochondrium. Prawidłowe fałdowanie prowadzi do utworzenia charakterystycznej drugo-, trzecio- i czwartorzędowej przestrzennej struktury warunkującej prawidłowe funkcjonowanie białka. Większość białek samoczynnie przybiera prawidłową konformację, jednak ~ 10% białek przybiera konformację przestrzenną odmienną od pożądanej, zwłaszcza jeżeli jest ona termodynamicznie korzystniejsza. Prowadzi to w najlepszym wypadku do utraty aktywności takiego białka, a w najgorszym do uzyskania nowych, szkodliwych właściwości, często zależnych od jego agregacji.

Białka opiekuńcze (ang. *chaperones*) są ATP-azami posiadającymi wysokie powinowactwo do hydrofobowych odcinków łańcuchów polipeptydowych. Ich oddziaływanie z powstającym łańcuchem polipeptydowym zapewnia jego prawidłowe sfałdowanie. W dojrzałym, prawidłowo sfałdowanym białku odcinki hydrofobowe są schowane wewnątrz białka lub oddziałują z lipidami. Białka opiekuńcze występują zarówno na obszarze cytosolu, jak i w jądrze komórkowym oraz w świetle organelli błoniastych, takich jak siateczka śródplazmatyczna czy mitochondria. Należą do dwóch głównych rodzin określanych jako **hsp60** i **hsp70**. Białka z rodziny hsp70 działają jako monomery, wiążąc się z odcinkami hydrofobowymi nowo syntetyzowanych łańcuchów polipeptydowych oraz z eksponowanymi wskutek denaturacji hydrofobowymi obszarami białek. Z kolei białka z rodziny hsp60 tworzą kompleksy w kształcie pustego w środku cylindra, składające się z wielu podjednostek. Przypuszcza się, iż nieprawidłowo sfałdowane białka dostają się do środka tego kompleksu, gdzie ulegają kolejnym zmianom konformacji.

Nazwa „hsp" oznacza **białko szoku cieplnego** (ang. *heat shock protein*). Wywodzi się od tego, iż wzmożoną ekspresję tych białek wykryto najpierw w komórkach poddanych działaniu wysokiej temperatury. Białka opiekuńcze ulegają wzmożonej ekspresji także pod wpływem innych czynników, mogących prowadzić do denaturacji białek. Oprócz wzmożonej temperatury, należą tutaj nadmiernie obniżona temperatura, obecność jonów metali ciężkich, zmiany osmolarności, promieniowanie jonizujące, czy też ekspresja nieprawidłowych, zmutowanych lub wirusowych białek itp. Biał-

ka opiekuńcze wykazują wyjątkową odporność na działanie czynników denaturujących.

Białka opiekuńcze potrafią się także wiązać ze zdenaturowanymi i rozfałdowanymi białkami komórkowymi, przywracając im prawidłową konformację przestrzenną. Energia potrzebna na rozplątanie nieprawidłowej konformacji łańcucha polipeptydowego pochodzi z hydrolizy ATP zachodzącej pod wpływem białek opiekuńczych. Białka, którym prawidłowej konformacji przestrzennej nie daje się przywrócić, ulegają zależnej od białek opiekuńczych ubikwitynacji, co predestynuje je do degradacji przez proteasomy. Nieprawidłowo sfałdowane białka mają tendencję to agregowania poprzez oddziaływanie eksponowanych odcinków hydrofobowych. Tak powstałe agregaty wytrącają się z cytosolu w nierozpuszczalne twory, formujące w komórkach różnego rodzaju ciałka inkluzyjne, zwane niekiedy **agresomami**, co często jest niekorzystne dla komórki i prowadzi do jej apoptozy.

Inną funkcją białek opiekuńczych jest utrzymywanie łańcucha polipeptydowego w stanie niesfałdowanym, celem jego przemieszczenia przez wąskie kanały prowadzące w poprzek błon. Ma to miejsce w czasie importu białek do mitochondriów. ATP hydrolizowane przez białka opiekuńcze od strony światła mitochondriów czy siateczki śródplazmatycznej dostarcza także energii potrzebnej nie tylko do zmian konformacji przestrzennej, lecz także do transportu białka w poprzek błony.

KLINIKA

Priony są to cząsteczki białka o nieznanej funkcji występującego w ośrodkowym układzie nerwowym ssaków. Białko prionowe może występować w dwóch konformacjach przestrzennych, prawidłowej i *scrapie*. Białko w formie *scrapie* ma właściwość wiązania się z prawidłowymi cząsteczkami białka prionowego i zmiany ich konformacji przestrzennej w formę *scrapie* na zasadzie zbliżonej do działania białek opiekuńczych. Forma *scrapie* białka prionowego wywołuje postępującą gąbczastą degenerację mózgu prowadzącą do zgonu. Proces ten u bydła wywołuje tzw. chorobę szalonych krów, zaś u ludzi znany jest jako **choroba Creutzfeldta-Jakoba**.

Ubikwitynacja białek

Adresowanie i sortowanie białek w komórkach zależy niekiedy od przyczepionych do białka swoistych „etykiet adresowych" (ang. *tags*). Rolę takiej etykiety szczególnie często spełnia drobnocząsteczkowe białko zwane **ubikwityną** oraz pokrewne białka, takie jak **SUMO** (ang. *small ubiquitin-like modifier*). Przyłączenie jednej cząsteczki ubikwityny do dowolnego białka nazywa się **monoubikwitynacją**, podczas gdy przyłączenie się łańcucha złożonego z większej liczby cząsteczek ubikwityny to **poliubikwitynacja**. Z kolei przyłączenie kilku pojedynczych cząsteczek ubikwityny w różnych częściach znakowanego łańcucha polipeptydowego nazywane jest **multibikwitynacją**.

Ubikwityna jest krótkim polipeptydem (76 aminokwasów) przyłączanym kowalencyjnie do substratów za pomocą **wiązania izopeptydowego** pomiędzy resztą karboksylową ostatniej glicyny ubikwityny a wolną resztą epsilon–aminową lizyny substratów w dowolnej pozycji łańcucha. Ponieważ ubikwityna ma siedem reszt lizyny, mogą one również ulec ubikwitynacji, tworząc łańcuchy składające się z kilku do kilkunastu cząsteczek ubikwityny.

Ubikwitynacja jest reakcją wymagającą kaskady enzymów, na którą składa się **enzym aktywujący ubikwitynę (E1)** poprzez hydrolizę ATP, **enzym koniugujący ubikwitynę (E2)** oraz **ligaza ubikwitiny (E3)**. Jest to system hierarchiczny, w którym występują dwa enzymy E1, kilkanaście enzymów E2 oraz kilkaset modularnych enzymów E3, które rozpoznają specyficzne sekwencje i motywy strukturalne w obrębie substratów, często zależne od fosforylacji (ryc. 8.5).

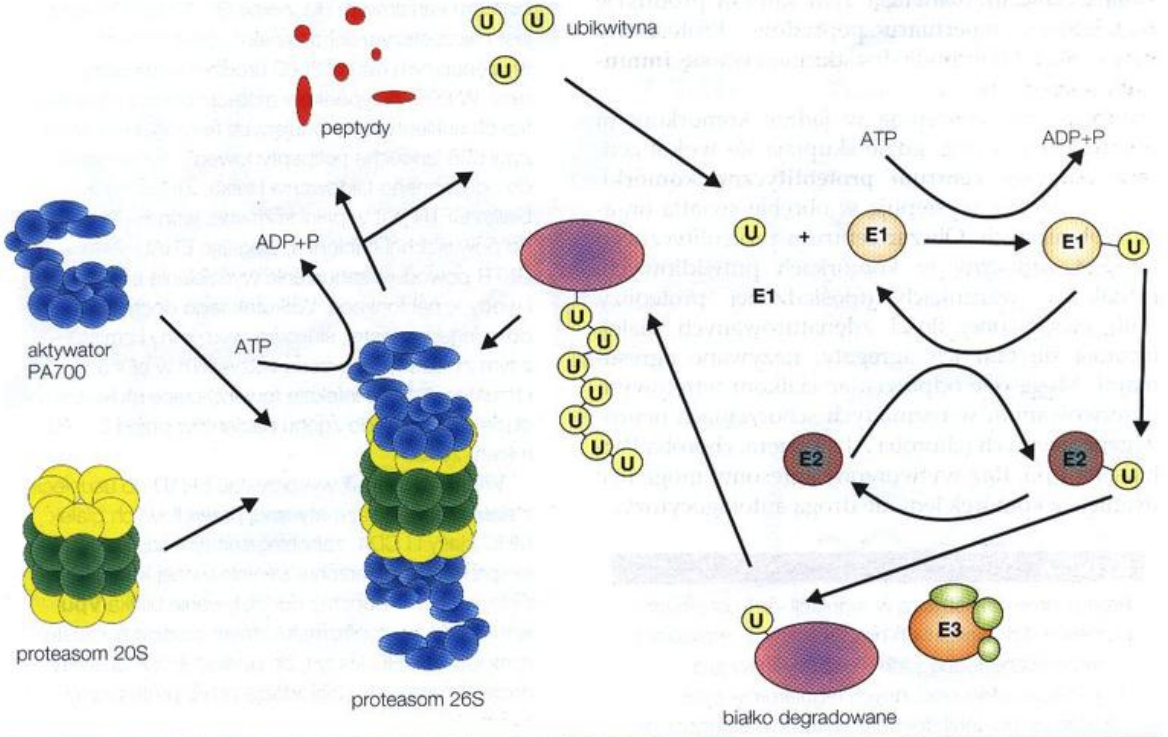
Poliubikwitynacja łańcuchami łączącymi się poprzez **lizynę 48** prowadzi do adresowania białek przeznaczonych do degradacji. Poliubikwitynacja łańcuchami łączącymi się poprzez inne lizyny służy odmiennym celom. Na przykład poliubikwitynacja łańcuchami łączącymi się przez lizynę 63 uczestniczy w endocytozie, naprawie DNA i przekazywaniu sygnałów związanych z procesami zapalnymi. Monubikwitynacja oraz multiubikwitynacja cytoplazmatycznych odcinków wielu białek receptorowych prowadzi do ich endocytozy oraz gromadzenia się w przedziale endosomalnym. Przyłączenie SUMO-1 do białek uczestniczy w adresowaniu białek, powodując ich redystrybucję z cytoplazmy do porów jądrowych lub do centrosomów. Należy tutaj też wspomnieć, że ubikwitynowanie białek nie jest procesem nieodwracalnym. Cząsteczki ubikwityny mogą zostać odłączone od białek pod wpływem specyficznych **enzymów deubikwitynujących**.

Proteasomy

Proteasomy są organellami występującymi we wszystkich zbadanych do tej pory komórkach eukariotycznych oraz w niektórych bakteriach. Wy-

stępują one w dwóch postaciach: rdzeniowych **proteasomów 20S** oraz **proteasomów 26S** powstałych w wyniku powiązania się proteasomów 20S z aktywatorem **PA700,** zwanym także czapeczką 19S (S oznacza jednostki sedymentacji Svedberga). Proteasomy 20S mają masę cząsteczkową ok. 700 kDa. Zbudowane są z czterech pierścieni ułożonych jeden na drugim na kształt cylindra. Każdy pierścień składa się z siedmiu cząsteczek białka, zwanych **podjednostkami proteasomów**. W odróżnieniu od klasycznych enzymów proteolitycznych proteasomy mają wiele różnych aktywności proteolitycznych warunkowanych obecnością trzech par miejsc aktywnych skierowanych do środka cylindra. Proteasomy 20S degradują jedynie krótkie peptydy oraz nieliczne niesfałdowane białka. Degradacja sfałdowanych białek wyznakowanych poliubikwityną wymaga proteasomów 26S. Podjednostki aktywatora PA700 umożliwiają związanie białka znakowanego łańcuchem poliubikwityny, jego rozfałdowanie, otworzenie kanału prowadzącego do rdzenia proteasomu, wprowadzenie łańcucha polipeptydowego do środka tegoż kanału, odłączenie poliubikwityny i następnie jej podział na monomery ubikwityny ulegające reutylizacji. Procesy te wymagają dostarczenia energii poprzez hydrolizę ATP dokonywaną przez podjednostki PA700 mające właściwości ATP-azy.

Główną fizjologiczną rolą proteasomów jest degradacja większości białek komórkowych, zarówno białek regulacyjnych o krótkim okresie półtrwania, jak i stosunkowo stabilnych białek strukturalnych (ryc. 8.5). Ich istotną rolą jest także rozpoznawanie i usuwanie tych białek, które uległy denaturacji i przybrały nieprawidłową konformację. Mogą one pochodzić zarówno z cytoplazmy i obszaru jądra komórkowego, jak i z siateczki śródplazmatycznej (ERAD). Do tej kategorii zaliczają się też defektywne produkty rybosomalne, czyli **DRIP** (ang. *defective ribosomal products*), czyli błędnie zakończone lub błędnie sfałdowane białka, rozpoznawane jeszcze w połączeniu z rybosomem. Większość znanych substratów proteasomu ulega wcześniejszej poliubikwitynacji. Umożliwia to ich rozpoznanie przez



Rycina 8.5 Schemat układu degradacji białek zależnego od ubikwityny i proteasomów. Ubikwityna ulega aktywacji przez E1 z udziałem hydrolizy ATP. Enzym koniugujący (E2) – zwykle z udziałem jednego z wielu kompleksów ligazy ubikwityny (E3) – rozpoznaje właściwe białko, mające ulec degradacji, i katalizuje przyłączanie reszt ubikwityny. Łańcuch poliubikwityny stanowi sygnał do rozpoznania substratu przez proteasom 26S, który degraduje oznakowane białko do krótkich peptydów i uwalnia ubikwitynę. Proteasom 26S składa się z proteasomu 20S oraz kompleksu regulacyjnego zwanego aktywatorem PA700.

kompleks regulatorowy proteasomu. Proteasom nie rozkłada białek do aminokwasów, lecz do peptydów o zmiennej długości, zwykle wahającej się pomiędzy 8 a 15 aminokwasów. Peptydy te ulegają dalszej degradacji do aminokwasów zależnej od endo- i egzopeptydaz plazmatycznych. Stanowią one także źródło peptydów ulegających importowi do siateczki śródplazmatycznej poprzez specjalny transporter **TAP** (ang. *transporter for antigen processing*). W świetle siateczki peptydy te łączą się z cząsteczkami MHC klasy I, a następnie ulegają egzocytozie i prezentacji na powierzchni komórki. Ponieważ degradacji ulegają zarówno białka własne komórki, jak i białka wirusowe, system ten umożliwia wczesną prezentację na powierzchni komórki immunogennych peptydów pochodzących z białek wirusowych. Ponieważ proteasomy degradują też DRiP pochodzące od białek wirusowych, umożliwia to bardzo wczesne rozpoznanie komórki zakażonej wirusem przez układ immunologiczny. Co więcej, interferon gamma indukuje ekspresję odmiennych podjednostek katalitycznych proteasomu, które mają nieco inne właściwości katalityczne, umożliwiając tym samym produkcję odmiennego repertuaru peptydów. Proteasomy zawierające takie podjednostki nazywa się **immunoproteasomami**.

Proteasomy występują w jądrze komórkowym oraz w cytoplazmie, gdzie skupiają się wokół centrioli, tworząc **centrum proteolityczne komórki**. Proteasomy nie występują w obrębie światła organelli błoniastych. Obszar centrum proteolitycznego nie jest widoczny w komórkach prawidłowych, jednak w warunkach upośledzonej proteolizy i/lub zwiększonej ilości zdenaturowanych białek formują się tam ich agregaty, nazywane **agresomami**. Mogą one odpowiadać ciałkom wtrętowym obserwowanym w rozmaitych schorzeniach neurodegeneracyjnych (choroba Alzheimera, choroba Parkinsona itp.). Raz wytworzone agresomy mogą być usunięte z komórek jedynie drogą autofagocytozy.

KLINIKA

Proteasomy uczestniczą w regulacji wielu istotnych procesów fizjologicznych oraz w licznych zjawiskach chorobowych. Jedną z ich kluczowych ról jest degradacja cyklin oraz innych regulatorów cyklu komórkowego. Inhibitory proteasomów są obecnie szeroko stosowane w leczeniu szpiczaka mnogiego, a także innych chorób nowotworowych. Inhibitory proteasomów hamują także odczyn zapalny poprzez zapobieganie aktywacji czynnika NFκB

Degradacja związana z siateczką śródplazmatyczną (ERAD)

Szorstka siateczka śródplazmatyczna ma rodzaj systemu kontroli jakości, który wykrywa pojawienie się w jej obrębie nadmiaru rozfałdowanych lub nieprawidłowych białek. Białka takie ulegają **transportowi zwrotnemu** do cytoplazmy poprzez kompleks translokonu. Energii do retrotranslokacji dostarcza duża heksameryczna ATP-aza znana jako białko zawierające walozynę, czyli **VCP** (ang. *valosin containing protein*). VCP rekrutuje enzymy kaskady ubikwitynacji oraz proteasomy 26S, doprowadzając do degradacji eksportowanych z siateczki śródplazmatycznej białek. VCP pełni też rolę białka opiekuńczego, zapobiegając agregacji eksportowanych białek w cytozolu. Cały ten proces nazywa się degradacją związaną z siateczką śródplazmatyczną, czyli **ERAD** (ang. *ER-associated degradation*).

KLINIKA

Mutacja genu ***CFTR*** (ang. *cystic fibrosis transmembrane regulator*) jest przyczyną choroby zwanej **mukowiscydozą**. CFTR jest transbłonowym białkiem kanałowym dla jonów Cl^-. Mukowiscydoza jest najczęstszym schorzeniem genetycznym, występującym raz na 3000 urodzeń ludzi białej rasy. W 80% przypadków mutacja polega na delecji trzech nukleotydów kodujących fenyloalaninę w pozycji 508 łańcucha polipeptydowego, co prowadzi do odmiennego fałdowania białka. Zmutowane białko CFTR jest w pełni sprawne, jednak nie dociera do powierzchni nabłonka, ulegając ERAD. Brak CFTR powoduje zaburzenia wydzielania elektrolitów i wody w nabłonkach. Wskutek tego dochodzi do zalegania gęstej, śluzowej wydzieliny i zmian z tym związanych, przede wszystkim w płucach i trzustce. Częste infekcje towarzyszące mukowiscydozie prowadzą do zgonu pacjentów przed 30–40 rokiem życia.

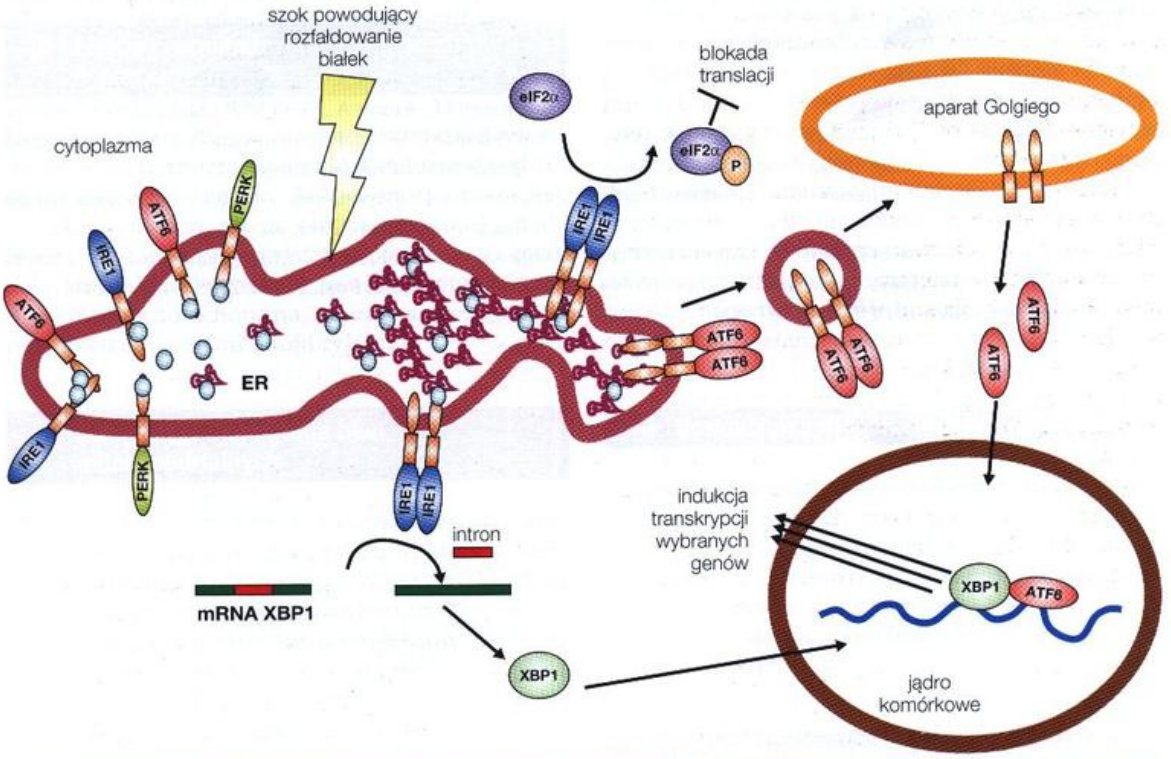
Wirus HIV potrafi wykorzystać ERAD do usunięcia z siateczki śródplazmatycznej prawidłowych białek MHC klasy I i CD4, zapobiegając tym samym ich ekspresji na powierzchni zainfekowanej komórki. Odbywa się to poprzez oddziaływanie białka **Vpu** wirusa HIV z cytoplazmatycznymi częściami cząsteczek CD4 i MHC klasy I, co powoduje ich ubikwitynację, a następnie degradację przez proteasomy.

Odpowiedź rozfałdowanych białek (UPR)

Przeładowanie siateczki śródplazmatycznej nieprawidłowo sfałdowanymi białkami z powodu zablokowania ERAD, nadmiernej syntezy zmutowanych

białek, infekcji wirusowej lub działania specyficznych toksyn albo innych czynników uszkadzających prowadzi do uruchomienia odpowiedzi komórkowej znanej jako **odpowiedź rozfałdowanych białek,** czyli **UPR** (ang. *unfolded protein response*) (ryc. 8.6). W warunkach prawidłowych w świetle siateczki występuje nadmiar **BiP**, które poza swoją funkcją w fałdowaniu białek przyłącza się także do luminalnych domen trzech efektorowych białek: **IRE1, PERK i ATF6**. Białka te w kompleksie z BiP utrzymywane są w monomerycznej, nieaktywnej postaci. W warunkach pojawienia się nadmiaru rozfałdowanych białek cząsteczki BiP ulegają rekrutacji do tychże białek, a co za tym idzie BiP odłącza się od IRE1, PERK i ATF6. Umożliwia to dimeryzację białek efektorowych oraz ich następczą aktywację. Każde z tych białek ma domenę cytoplazmatyczną pełniącą ściśle określoną funkcję.

PERK jest kinazą fosforylującą czynnik inicjacji translacji białek eIF2α, co blokuje syntezę większości nowych łańcuchów polipeptydowych. IRE1 jest endonukleazą wycinającą intron z mRNA dla czynnika transkrypcyjnego **XBP1**. Umożliwia to powstanie aktywnego czynnika XBP1, który indukuje wybiórczą transkrypcję genów dla czynników przeciwdziałających nieprawidłowemu fałdowaniu się białek, takich jak BiP. W końcu zdimeryzowane ATF6 ulega transportowi do aparatu Golgiego, gdzie następuje jego częściowa proteoliza uwalniająca domenę cytoplazmatyczną posiadającą NLS. Aktywny fragment ATF6 dostaje się do jądra komórkowego i wspomaga działanie czynnika XBP1 w indukcji transkrypcji genów przeciwdziałających nieprawidłowemu fałdowaniu białek. Co ciekawe, podczas gdy synteza większości białek jest zablokowana, indukowane pod wpływem ATF6 i XBP1



Rycina 8.6 Schemat odpowiedzi rozfałdowanych białek (UPR). Ponieważ białko opiekuńcze siateczki śródplazmatycznej (ER) BiP (*niebieskie owale*) ma wysokie powinowactwo do rozfałdowanych białek, szok wywołujący rozfałdowanie białek powoduje dysocjację BiP od błonowych białek efektorowych siateczki śródplazmatycznej (IRE1, PERK, ATF6). Po uwolnieniu od BiP białka efektorowe ulegają dimeryzacji i następczej aktywacji. IRE1 jest endonukleazą powodującą alternatywne składanie dla mRNA czynnika transkrypcyjnego XBP1. PERK fosforyluje czynnik inicjacji translacji eIF2α, co powoduje blokadę translacji większości białek. ATF6 przemieszcza się do aparatu Golgiego, gdzie odcięciu ulega jego domena cytoplazmatyczna, przemieszczająca się następnie do jądra komórkowego. ATF6 oraz XBP1 indukują transkrypcję zestawu genów kodujących białka uczestniczące w UPR, takie jak białka opiekuńcze.

mRNA ma specjalną sekwencję umożliwiającą ich translację, pomimo fosforylacji eIF2α. Reasumując, UPR ma charakter odpowiedzi adaptującej komórkę do niekorzystnych warunków środowiskowych, sprzyja więc jej przeżyciu. Przedłużająca się odpowiedź UPR uruchamia jednak program apoptozy komórek.

KLINIKA

UPR ma wielkie znaczenie medyczne. Na przykład, w początkowym okresie cukrzycy typu drugiego komórki beta wysepek Langerhansa ulegają nadmiernej stymulacji do syntezy insuliny, co doprowadza do przeładowania siateczki śródplazmatycznej i w konsekwencji do UPR. Przedłużająca się UPR prowadzi do apoptozy niektórych komórek beta, zwiększając obciążenie produkcją insuliny pozostałych przy życiu komórek beta, co w konsekwencji nasila ich apoptozę. Z tego powodu w miarę postępu cukrzycy spada produkcja endogennej insuliny, doprowadzając w końcu do konieczności podawania insuliny egzogennej.

Piśmiennictwo

Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walker P.: *The Cell*. Wydanie 5. Garland Science. Nowy Jork 2008. Rozdział 13. *Intracellular Vesicular Traffic*. S. 749–812.

Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walker P.: *The Cell*. Wydanie 5. Garland Science. Nowy Jork 2008. *From RNA to Protein*. S. 367–400.

Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walker P.: *The Cell*. Wydanie 5. Garland Science. Nowy Jork 2008. Rozdział 12. *Intracellular Compartments and Protein Sorting*. S. 695–748.

Bury M., Niemierko A.: *Proteasomalna degradacja białek komórkowych*. Post. Biol. Kom. 2005, 32, 435–448.

Guenther I., Kędzierska-Mieszkowska S.: *System kontroli jakości białek w cytoplazmie – rola białek opiekuńczych w biologii chorób neurodegeneracyjnych*. Post. Bioch. 2011, 57, 274–282.

Jędrzejowska I.: *Krople lipidowe: nowe spojrzenie na strukturę, biogenezę i funkcje*. Post. Biol. Kom. 2010, 37, 449–470.

Kamińska J., Hoffman-Sommer M., Płachta M.: *Białka z rodziny p24 – regulatory transportu pęcherzykowego*. Post. Biochem. 2010, 56, 75–82.

Kordowiak A.M., Kordowiak Jr. S.: *Tratwy lipidowe – mikrodomeny* błon biologicznych. Post. Biol. Kom. 2011, 38, 231–245.

Lodish H., Berk A., Kaiser C.A., Krieger M., Bretscher A., Ploegh H., Amon A., Scott M. P.: *Molecular Cell Biology*. Wydanie 7. W. H. Freeman i spółka. Nowy Jork 2013. Rozdział 14. *Vesicular Traffic, Secretion and Endocytosis*. S. 627–670.

Lodish H., Berk A., Kaiser C.A., Krieger M., Bretscher A., Ploegh H., Amon A., Scott M.P.: *Molecular Cell Biology*. Wydanie 7. W. H. Freeman i spółka. Nowy Jork 2013. Rozdział 3.2 *Protein Folding*. S. 70–77.

Stradomska T.: *Peroksysomy – funkcje i zaburzenia metaboliczne*. Post. Bioch. 2011, 57, 183–190.

Wojtczak L., Zabłocki K.: *Mitochondria w życiu, chorobie i śmierci komórki*. Post. Bioch. 2008, 54, 129–141.

ROZDZIAŁ 9

Morfologia i funkcja mitochondriów

Lilla Hryniewiecka, Małgorzata Piasecka

HASŁA

Liczba i rozmieszczenie mitochondriów w komórce

Kształt, wielkość, liczba i rozmieszczenie mitochondriów w komórce zmieniają się w zależności od rodzaju i funkcji komórki. Mitochondria mogą być zlokalizowane na całym obszarze komórki bądź tylko w jej części przypodstawnej lub też na obwodzie komórki. W tkance mięśniowej poprzecznie prążkowanej mitochondria, tworząc szeregi, występują między licznymi miofibrylami.

Lokalizacja i topografia błon mitochondrialnych

Mitochondria są otoczone dwiema błonami. Różnią się one rodzajem, zawartością lipidów, białek, przepuszczalnością i funkcją. Wewnętrzna błona tworzy liczne grzebienie mitochondrialne, w których znajdują się enzymy kompleksów łańcucha oddechowego i syntaza ATP. Wyróżnia się przestrzeń międzybłonową (przedział zewnętrzny) i matriks mitochondrialną (przedział wewnętrzny). Przedziały są molekularnie i funkcjonalnie odmienne. Matriks mitochondrialna pod względem enzymatycznym jest najbogatszym i najbardziej zróżnicowanym przedziałem, a zawarte w niej układy enzymatyczne zmieniają się w zależności od rodzaju komórki.

Morfologia mitochondriów

Komórki aktywne metabolicznie, wykazujące duże zapotrzebowanie na ATP, mają liczne mitochondria, z silnie pofałdowaną wewnętrzną błoną i ciemną matriks mitochondrialną. Komórki starzejące się lub niezróżnicowane, w tym również niektóre komórki nowotworowe niewykazujące aktywnego metabolizmu tlenowego, mają natomiast mitochondria małe, z niewielką liczbą grzebieni mitochondrialnych i jasną matriks. Nietypowe mitochondria, zawierające cewkowate grzebienie mitochondrialne, występują w komórkach steroidogennych. Długie, zakrzywione mitochondria zlokalizowane w plemniku tworzą osłonkę mitochondrialną, funkcjonującą jako jedno organellum dostarczające energii.

Uszkodzenia mitochondriów

Zmiany morfologiczne mitochondriów mogą występować w różnych patologicznych warunkach klinicznych i eksperymentalnych. Obserwuje się obrzmienia mitochondriów, tworzenie się struktur mielinopodobnych, zmniejszenie lub zwiększenie liczby i wielkości mitochondriów oraz obecność w matriks elektronowogęstych ziarnistości.

ATP jako uniwersalny przenośnik energii swobodnej w komórce

ATP jest cząsteczką bogatą w energię, ponieważ dwie z jej trzech grup fosforanowych są połączone wysokoenergetycznym wiązaniem fosfobezwodnikowym. Korzystna energetycznie reakcja hy-

drolizy końcowej grupy fosforanowej prowadzi do powstania ADP i P_i, przy czym odłączona grupa fosforanowa z łatwością zostaje przenoszona na inną cząsteczkę i energizuje ją. Dzięki temu ATP pośredniczy między reakcjami uwalniającymi energię a reakcjami wymagającymi energii.

Łańcuch oddechowy

Łańcuch oddechowy składa się z czterech transbłonowych kompleksów enzymatycznych: dehydrogenazy NADH (I), dehydrogenazy bursztynianowej (II), kompleksu cytochromów bc_1 (III) i oksydazy cytochromowej (IV). Transportują one elektrony pochodzące z substratów cyklu kwasu cytrynowego do O_2, wykorzystując takie przenośniki elektronowe, jak: dwa rodzaje centrów żelazo-siarkowych, cytochromy typu b, c i a oraz atomy miedzi. Dehydrogenaza NADH wprowadza do łańcucha oddechowego elektrony z matriksowej puli NADH za pośrednictwem FMN, podczas gdy dehydrogenaza bursztynianowa przekazuje do łańcucha oddechowego elektrony z bursztynianu przekształconego w fumaran, a odebrane przez FAD. W skład łańcucha oddechowego, poza wielkimi kompleksami enzymatycznymi, wchodzą dwa ruchome przenośniki elektronów, hydrofobowy ubichinon (koenzym Q) i małe peryferyczne białko cytochrom c. Ubichinon przenosi elektrony z kompleksów I i II na kompleks III. Odbiera też elektrony z flawoprotein związanych z czółenkiem glicerolofosforanowym i β-oksydacją kwasów tłuszczowych. Cytochrom c przenosi elektrony z kompleksu III na kompleks IV.

Potencjały oksydoredukcyjne (redoks)

Kolejność przenośników elektronów w łańcuchu oddechowym jest wyznaczana przez potencjały oksydoredukcyjne, będące miarą powinowactwa tych przenośników do elektronów. Ułożenie przenośników według wzrastającego powinowactwa do elektronów decyduje o tym, że reakcja przeniesienia elektronów z NADH do O_2 jest termodynamicznie korzystna, tzn. uwalnia znaczną ilość energii.

Hipoteza chemiosmotyczna Mitchella

Hipoteza chemiosmotyczna zakłada, że energia uwalniana w czasie transportu elektronów przez łańcuch oddechowy zostaje wykorzystana do tworzenia w poprzek wewnętrznej błony mitochondrialnej gradientu protonowego, niezbędnego jako siła napędowa syntezy ATP. Czynnikiem sprzęgającym transport elektronów z fosforylacją oksydacyjną jest więc gradient H^+. Kompleksy I, III i IV wypompowują protony z matriks do przestrzeni międzybłonowej dzięki zmianom konformacyjnym wywołanym przez energię uwalnianą podczas dużego spadku potencjału oksydoredukcyjnego w trzech miejscach fosforylacyjnych. Nierównomierne rozłożenie H^+ po obu stronach błony prowadzi do powstania ΔpH i $\Delta\psi$, razem tworzących siłę protonomotoryczną (Δp).

Syntaza ATP

Syntaza ATP katalizuje fosforylację ADP do ATP. Orientacja enzymu w wewnętrznej błonie mitochondrialnej umożliwia jego współpracę z łańcuchem oddechowym; umiejscowiona w błonie podjednostka F_0 jest kanałem dla H^+, a zlokalizowana w matriks mitochondrialnej podjednostka F_1 przeprowadza syntezę ATP. Siłą napędową enzymu jest gradient H^+ utworzony z energii uwalnianej podczas transportu elektronów przez łańcuch oddechowy. Protony wchodzą do syntazy ATP przez kanał F_0 i wywołują cykliczne zmiany konformacyjne w części katalitycznej enzymu, F_1, powodujące zmiany powinowactwa miejsc katalitycznych w podjednostkach β do ADP i ATP. Podstawą cyklu jest kooperatywne działanie podjednostek wchodzących w skład F_1. Powiązanie zmian konformacyjnych w miejscach katalitycznych z przepływem H^+ przez F_0 jest możliwe dzięki temu, że syntaza ATP działa jako motor molekularny. Podczas utleniania NADH są syntetyzowane do 2,5 cząsteczki ATP, a podczas utleniania $FADH_2$ powstaje 1,5 cząsteczki ATP.

Kontrola oddechowa i współczynnik kontroli oddechowej

Ilość syntetyzowanego ATP jest kontrolowana przez intensywność metabolizmu. Duże stężenie ADP w komórce przyspiesza działanie syntazy ATP, co z kolei przyspiesza transport elektronów i zużycie O_2, zwiększa aktywność cyklu kwasu cytrynowego i pośrednio glikolizy oraz utleniania kwasów tłuszczowych. Gdy cały ADP zostanie ufosforylowany do ATP, szybkość transportu elektronów maleje, a zatem i zużycie O_2. Kontrola oddechowa jest więc

procesem regulującym intensywność oddychania w zależności od zapotrzebowania komórki na ATP. Wskaźnikiem stosowanym do oceny jakości preparatu mitochondrialnego jest współczynnik kontroli oddechowej.

Inhibitory łańcucha oddechowego i fosforylacji oksydacyjnej

Znane są inhibitory hamujące aktywność poszczególnych kompleksów łańcucha oddechowego (rotenon, amytal, piericydyna A, malonian, antymycyna, myksotiazol, cyjanek, azydek i tlenek węgla) oraz inhibitory fosforylacji oksydacyjnej, które hamują aktywność syntazy ATP (oligomycyna), blokują wymianę ADP/ATP (atraktylozyd, karboksyatraktylozyd i kwas bongkrekowy) albo, przyczyniając się do przepuszczalności wewnętrznej błony dla H^+, niwelują Δp (DNP, FCCP).

Mutacje genomu mitochondrialnego przyczyną zaburzeń energetycznych

Mutacje punktowe i delecje w mtDNA prowadzą do zaburzeń syntezy białek mitochondrialnych w obrębie mitochondriów i transportu elektronów wzdłuż łańcucha oddechowego, co powoduje upośledzenie fosforylacji oksydacyjnej i funkcji energetycznej mitochondriów. Kliniczna ekspresja tych zaburzeń, czyli choroba mitochondrialna, zależy od stosunku zmutowanego mtDNA do prawidłowego, gdyż w komórce koegzystują niezmutowane kopie mtDNA i takie, które zawierają patogenne mutacje.

Morfologia mitochondriów

Liczba i rozmieszczenie mitochondriów w komórce

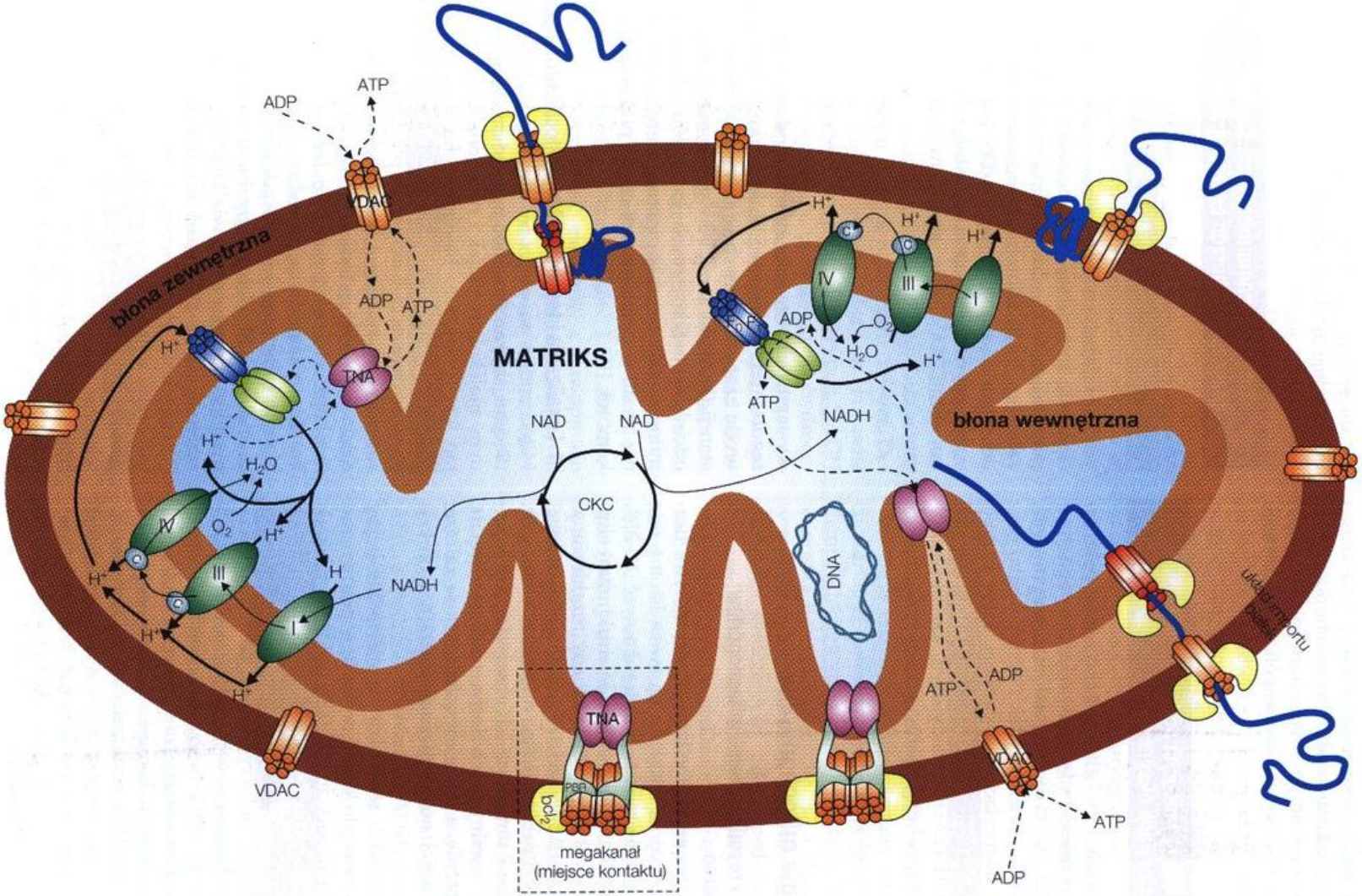
Mitochondria są organellami występującymi licznie w komórce, ze względu na swoją istotną rolę w energetyce komórki. Mogą zajmować 12–25% objętości komórki. Przeważnie są strukturami elipsoidalnymi, okrągłymi lub niekiedy rozgałęzionymi, o średnicy 0,5–1 μm i 1–7 μm długości, a nawet 10 μm w przypadku włókna mięśni szkieletowych. Taka wielkość umożliwia ich obserwację już w mikroskopie świetlnym. **Ich liczba, wielkość, kształt, rozmieszczenie, a także ultrastruktura są zależne od aktywności metabolicznej, rodzaju i funkcji komórki.**

W plemnikach stwierdza się niewielkie liczby mitochondriów (do kilkudziesięciu) w porównaniu z ich liczbą w oocycie (200 000) czy w komórkach somatycznych (kilka tysięcy). W komórkach nabłonkowych kanalików krętych nerek oraz w komórkach endokrynowych kory nadnerczy liczba mitochondriów wynosi 1000, a w hepatocytach 1000–2500. Małe liczby mitochondriów obserwuje się w: limfocytach, komórkach naskórka i słabo zróżnicowanych komórkach nowotworowych, a przede wszystkim w starzejących się komórkach.

Mitochondria są bardzo ruchliwymi organellami, stąd występują na całym obszarze komórki, głównie w części okołojądrowej. We włóknie mięśnia szkieletowego i w kardiomiocytach mitochondria występują zawsze między miofibrylami w postaci regularnych szeregów. W komórkach nabłonkowych, zaangażowanych w aktywny transport substancji (komórki kanalików proksymalnych nerek, odcinków prążkowanych gruczołów ślinowych), mitochondria, tworząc pionowe szeregi, leżą głównie w silnie pofałdowanej części przypodstawnej komórek.

Lokalizacja i topografia błon mitochondrialnych

Mitochondria są otoczone dwiema błonami różniącymi się zarówno pod względem morfologicznym, molekularnym, jak i funkcjonalnym (ryc. 9.1, tab. 9.1). Zewnętrzna błona mitochondrialna o grubości 6–7 nm ma powierzchnię gładką w przeciwieństwie do cieńszej (5–6 nm), silnie pofałdowanej błony wewnętrznej, tworzącej tzw. grzebienie mitochondrialne (lub fałdy mitochondrialne), widoczne w mikroskopie elektronowym jako lamelle (ryc. 9.2a). To silne pofałdowanie powoduje, że powierzchnia błony wewnętrznej jest zdecydowanie większa niż zewnętrznej. **Morfologia grzebieni mitochondrialnych i w związku z tym wielkość ich powierzchni zmienia się w zależności od rodzaju komórki.** Powierzchnia błony wewnętrznej wszystkich mitochondriów hepatocytu jest 5-krotnie większa niż powierzchnia błon zewnętrznych i 15–17-krotnie większa niż powierzchnia błony komórkowej. Najwięcej jednak grzebieni mitochondrialnych obserwuje się w mięśniu sercowym, gdzie ich liczba jest 3-krotnie większa niż w wątrobie, co jest zwią-



Rycina 9.1 Ultrastruktura mitochondriów. W wewnętrznej błonie mitochondrialnej występują kompleksy łańcucha oddechowego (I–IV) i F_0F_1 – syntaza ATP (F_0F_1 – ATP-aza); w zewnętrznej błonie zaznaczono hipotetyczne megakanały białkowe zbudowane z kanału VDAC (ang. *voltage dependent anion selective channel*), PBR (ang. *peripheral benzodiazepine receptor*) i białek bcl-2 oraz ze zlokalizowanej w wewnętrznej błonie translokazy nukleotydów adeninowych (TNA); Q – koenzym Q; c – cytochrom c; e – elektron; CKC (cykl kwasu cytrynowego).

Tabela 9.1 Składniki błon i przestrzeni mitochondrialnych

Błona mitochondrialna zewnętrzna	Przestrzeń międzybłonowa	Błona mitochondrialna wewnętrzna	Matriks	Enzymy matriks mitochondrialnej występujące w zależności od rodzaju komórki
Oksydaza monoaminowa (deaminacja monoamin, zakończenia presynaptyczne)	kinaza adenylanowa	składniki łańcucha oddechowego:	kompleks dehydrogenazy pirogronianowej	syntaza ALA[2]
Heksokinaza II	kinaza kreatynowa	reduktaza NADH-koenzym Q (wrażliwa na rotenon, kompleks I)	enzymy cyklu kwasu cytrynowego	oksydaza kopro- i protoporfirynogenu[2], ferrohelataza[2]
Cytochrom b_5	kinaza nukleozydodifosforanowa	koenzym Q	enzymy utleniania kwasów tłuszczowych	syntaza karbamoilifosforanu[3]
Dehydrogenaza NADH niewrażliwa na rotenon	peptydazy	reduktaza bursztynian-koenzym Q (II)	peptydazy	transkarbomylaza ornitynowa[3]
Syntaza acylo-CoA (tiokinaza)	liaza hemu cytochromu c	reduktaza cytochromowa (III) (cytochrom b, c_1)	mtDNA, RNA,	dehydrogenaza glutaminianowa[4]
Palmitoilotransferaza karnitynowa I		oksydaza cytochromowa (IV) (cytochrom a, a_3)	mt rybosomy, enzymy replikacji i transkrypcji	syntetaza glutaminianowa[5]
Kanał VDAC – poryna		cytochrom c	białka szoku termicznego	adrenodoksyna i jej reduktaza[1]
PBR – receptor dla benzodiazepiny		syntaza ATP		dehydrogenaza/izomeraza 3β-hydroksysteroidowa[1]
Białka rodziny bcl-2		palmitoilotransferaza karnitynowa II		1-hydroksylaza-25-hydroksy-D_3[6]
– receptory dla białek importowanych		translokaza karnityna/acylokarnityna		24-hydroksylaza-25-hydroksy-D_3
		cytochrom $P450_{SCC}$[1]		syntaza i liaza HMG-CoA
		białkowe nośniki metabolitów		dehydrogenaza D (-) 3-hydroksymaślanowa[7]
				dysmutaza ponadtlenkowa (Mn^{2+})[8]
				karboksylaza pirogronianowa[9]
				AspAT[10]

[1] Cytochrom P450, adrenodoksyna i jej reduktaza należą do enzymatycznego kompleksu SCC (*side chain cleavage*) biorącego udział w mitochondrialnym etapie steroidogenezy (przekształcanie cholesterolu w pregnenolon); występują w cewkowatych mitochondriach komórek steroidogennych, np. kory nadnerczy, gonad i łożyska; dehydrogenaza/izomeraza 3β-hydroksysteroidowa występuje w mitochondriach komórek Leydiga (komórki gruczołu śródmiąższowego gonady męskiej), bezpośrednio przekształca cholesterol w progesteron z pominięciem pregnenolonu.

[2] Syntaza ALA (syntaza kwasu δ-aminolewulinowego), oksydaza kopro-I protoporfobilinogenu i ferrohelataza są enzymamymi zaangażowanymi w syntezę porfiryn; zlokalizowane są w mitochondriach wątroby i komórek linii hemopoetycznej w szpiku kostnym.

[3] Enzym cyklu mocznikowego – mitochondria wątroby.

[4] Enzym odgrywający główną rolę w metabolizmie azotu; przeprowadza odwracalne utlenianie i dezaminację glutaminianu; rozpowszechniony w wielu tkankach.

[5] Przekształca amoniak w nietoksyczną glutaminę; w największych ilościach występuje w mitochondriach tkanki nerwowej.

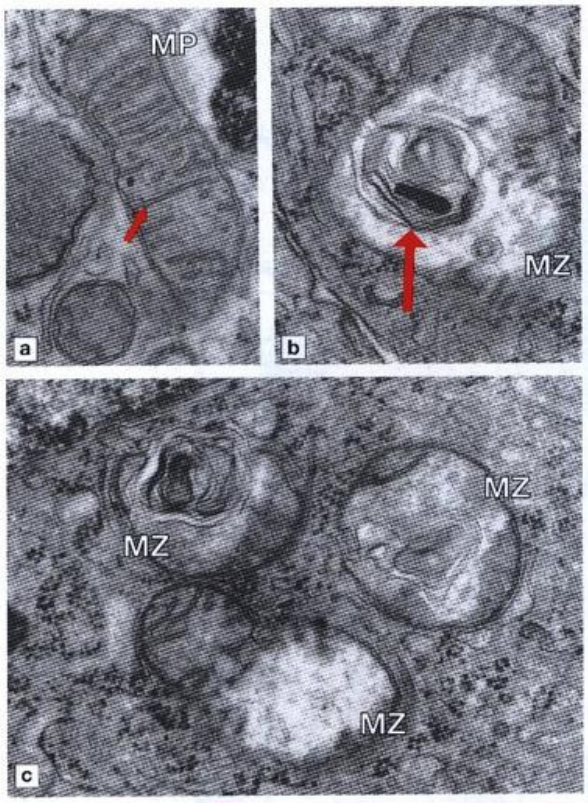
[6] Obie podane hydroksylazy katalizują powstawanie matabolitów witaminy D_3 – odpowiednio: 1,25 (OH) $_2D_3$ i 24,25 (OH) $_2D_3$; 1-hydroksylaza występuje w mitochondriach nerki, łożyska i kości, a 24-hydroksylaza w: nerce, chrząstkach, jelicie i łożysku.

[7] Syntaza i liaza HMG-CoA (3-hydroksy-3-metylo-glutarylo-CoA) oraz wymieniona dalej dehydrogenaza są enzymami szlaku ketogenezy, który występuje w mitochondriach wątroby.

[8] Enzym ten unieczynnia wolne anionorodniki ponadtlenkowe; mitochondrialny izoenzym zawiera Mn^{2+}.

[9] Enzym glukoneogenezy (synteza glukozy ze związków niewęglowodanowych), występuje w wątrobie i nerkach.

[10] Aminotransferaza asparaginianowa; bierze udział w przenoszeniu NADH z cytoplazmy do matriks mitochondrialnej (mostek jabłczanowo-asparaginianowy) (wątroba, mięśnie poprzecznie prążkowane, mózg); obok aminotransferazy alaninowej, wykorzystywana w diagnostyce enzymologicznej; w surowicy aktywność aminotransferazy zmienia się w zależności od uszkodzenia narządów; głębokie, patologiczne zmiany obejmujące uszkodzenia organelli komórkowych (np. wirusowe zapalenie i marskość wątroby, zawał mięśnia sercowego, dystrofia mięśni, zapalenie skóry) prowadzą do uwolnienia mitochondrialnego izoenzymu i wzrostu jego aktywności w surowicy.



Rycina 9.2 Ultrastruktura mitochondriów komórek nabłonkowych głowy przewodu najądrza szczura przewlekle traktowanego octanem ołowiu: **a**. mitochondrium o prawidłowej strukturze (MP), widoczne błony mitochondrialne, wewnętrzna błona jest pofałdowana i tworzy grzebienie mitochondrialne (*mała strzałka*), między którymi jest obecna ciemna matriks mitochondrialna; **b**, **c**. mitochondria obrzmiałe o zmienionej ultrastrukturze (MZ), zanikowi matriks i grzebieni mitochondrialnych towarzyszy pojawianie się lamelarnych struktur w obrębie matriks (*strzałka duża*); pow. × 50 000 (badania wykonano w Zakładzie Histologii i Embriologii Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie; Piasecka M. i wsp.: cyt. za: Ital. J. Anat. Embriol. 1999, 104, Suppl.).

zane z większym zapotrzebowaniem na ATP. Wewnętrzna powierzchnia błony wewnętrznej ujawnia obecność buławek (grzybków) o średnicy 8–10 nm, wykazujących aktywność syntazy i hydrolazy ATP. Liczba (kilka tysięcy/μm^2) i rozmieszczenie tych ziarnistości odzwierciedlają stan funkcjonalny mitochondriów. Obie błony mogą łączyć się ze sobą, tworząc tzw. miejsca kontaktu, zaangażowane m.in. w import białek do mitochondriów. Liczba i ich rozmieszczenie zmieniają się w zależności od stanów funkcjonalnych mitochondriów, rodzaju i aktywności metabolicznej oraz potrzeb komórki.

Charakterystyczny układ przestrzenny błon mitochondrialnych powoduje powstanie funkcjonalnie zróżnicowanych przestrzeni mitochondrialnych, czyli przedziałów (ryc. 9.1, tab. 9.1).

Przestrzeń międzybłonowa

Odległość między błonami mitochondrialnymi wynosi 4–8 nm. Wielkość przestrzeni międzybłonowej zmienia się w zależności od stanów funkcjonalnych mitochondriów. Tutaj znajdują się: kinaza nukleozydodifosforanowa, adenylanowa i kreatynowa. Ponadto przestrzeń ta zawiera peptydazy odcinające sekwencje sygnałowe białek, które są transportowane z cytoplazmy do przestrzeni międzybłonowej (cytochrom c_1, b_2). Innym enzymem tutaj występującym jest liaza hemu cytochromu c, łącząca hem z apocytochromem c, znajdującym się po zewnętrznej stronie wewnętrznej błony.

Matriks mitochondrialna

Matriks przypomina konsystencję żelu. Woda stanowi mniej niż 50% całej objętości matriks. Przedział ten pod względem enzymatycznym jest najbogatszym i najbardziej zróżnicowanym przedziałem mitochondrialnym, a zawarte w nim układy enzymatyczne zmieniają się w zależności od rodzaju komórki (tab. 9.1).

KLINIKA

Obok różnych białek matriks może zawierać elektronowogęste ziarnistości (20–50 nm), które są przede wszystkim precypitatami fosforanów wapnia, a ich obfite pojawianie się jest wyrazem kalcyfikacji mitochondriów, zwłaszcza w warunkach niedotlenienia lub działania czynników toksycznych.

Częściowa autonomia genetyczna mitochondriów jest związana z ich pochodzeniem, bowiem organella te najprawdopodobniej są potomkami bakterii *Rickettsia prowazekii* (tlenowa pałeczka Gram-ujemna, czynnik etiologiczny tyfusu plamistego przenoszonego przez wszy), wchłoniętej drogą endosymbiozy przez inną komórkę. Dlatego też matriks mitochondrialna obok DNA (mtDNA, mitochondrialny DNA) zawiera także enzymy (polimerazę DNA i RNA, syntetazę aminoacylo-tRNA) i czynniki białkowe niezbędne do replikacji, transkrypcji i translacji, co zdecydowanie przemawia za częściową niezależnością mitochondriów od genomu jądrowego i cytoplazmatycznych procesów translacyjnych. Synteza białek odbywa się na wolnych polirybosomach. Ponadto, matriks zawiera peptydazy odcinające sekwencje sygnałowe od białek importowanych do mitochondriów, które kodowane są na genomie jądrowym. Występują

w niej także białka szoku termicznego (Hsp, ang. *heat shock protein*), należące do białek opiekuńczych – chaperonów. Ich obecność zapobiega tworzeniu się niepożądanych i nieprawidłowych konformacji białek, co zapewnia prawidłowe funkcjonowanie mitochondriów.

Ze względu na genom mitochondrialny podział mitochondriów jest procesem skomplikowanym i kontrolowanym, w którym uczestniczą zarówno białka mitochondrialne, jak i cytoplazmatyczne oraz cysterny siateczki śródplazmatycznej.

Porównanie zawartości białek i lipidów w obu błonach mitochondrialnych

Błona zewnętrzna zawiera 50% lipidów i 50% białek. Zawartość białek w błonie wewnętrznej jest jednak zdecydowanie większa i wynosi 75–80%, co wiąże się z obecnością w niej białkowych nośników zaangażowanych w selektywny transport metabolitów i z funkcją energetyczną tej błony (białka kompleksów łańcucha oddechowego, syntaza ATP) (ryc. 9.1). Zdecydowanie więcej lipidów występuje w błonie zewnętrznej, która zawiera 3-krotnie więcej fosfatydyloinozytolu i 6-krotnie więcej cholesterolu niż błona wewnętrzna. Ta duża zawartość cholesterolu czyni zewnętrzną błonę mniej płynną. Nie zawiera jednak **kardiolipiny, fosfolipidu obecnego wyłącznie tylko w błonie wewnętrznej**. Kardiolipina występuje obok fosfatydylocholiny i fosfatydyloetanoloaminy w stosunku odpowiednio 2:3:4. Powoduje zmniejszenie przepuszczalności wewnętrznej błony mitochondrialnej.

Hydrofobowa struktura lipidowej dwuwarstwy błony jest barierą dla jonów i innych naładowanych cząsteczek. Tlen, dwutlenek węgla, amoniak i woda z łatwością przenikają przez obie błony mitochondrialne w procesie dyfuzji. Błona zewnętrzna dzięki porom dyfuzyjnym utworzonym przez białko – **porynę** (kanał VDAC, ang. *voltage-dependent anion channel*) działa jak filtr molekularny przepuszczający swobodnie małe cząsteczki (do 5 kDa), a zatrzymujący cząsteczki o dużej masie. Kanał VDAC jest zaangażowany m.in. w transport: ATP, ADP, kreatyny oraz cholesterolu. Dlatego też kinazy adenylanowa i kreatynowa, występujące w przestrzeni międzybłonowej, są zlokalizowane w jego pobliżu. Ponadto VDAC wraz z receptorem benzodiazepinowym (benzodiazepina – środek farmakologiczny działający uspokajająco, przeciwdrgawkowo i nasennie) i białkami rodziny bcl-2, zaangażowanymi w proces apoptozy, współuczestniczą w tworzeniu megakanałów w miejscach kontaktu błon. Istotnym składnikiem takich transbłonowych kanałów jest translokaza nukleotydów adeninowych zawarta w błonie wewnętrznej (ryc. 9.1). Błony mitochondrialne, dzięki zawartym w nich megakanałom mogą zmieniać swoją przepuszczalność. Pozwala to na uwolnienie tak dużej cząsteczki, jak cytochrom c (15 kDa), ale taka sytuacja występuje tylko w warunkach patologicznych i podczas apoptozy (odbywającej się szlakiem wewnątrzkomórkowym, z udziałem mitochondriów). Wówczas zamknięcie lub otwarcie megakanałów zależy od rodzaju i liczby białek rodziny bcl-2 (wyróżnia się białka pro- i antyapoptotyczne).

W przeciwieństwie do błony zewnętrznej, błona wewnętrzna jest nieprzepuszczalna dla większości kationów (np. H^+, Na^+, NH_4^+, K^+, Ca^{2+}) i anionów (np. Cl^-, HCO_3^-), cząsteczek ADP, ATP, formy utlenionej i zredukowanej NAD(P), glukozy, pirogronianu, aminokwasów, kwasów dwu- i trójkarboksylowych, acylo- i acetyloCoA. Większość wymienionych związków jest jednak niezbędna do prawidłowego funkcjonowania mitochondriów. Dlatego też są transportowane do matriks, ale w sposób kontrolowany w zależności od potrzeb komórki. Przenoszone są za pomocą specjalnych nośników białkowych w błonie wewnętrznej, na zasadzie symportu i/lub antyportu albo enzymów i układów enzymatycznych – mechanizmów wahadłowych – funkcjonujacych po obu stronach błony (czółenka jabłczanowo-asparginowe i glicerolofosforanowe). Nieprzepuszczalność wewnętrznej błony dla wielu jonów umożliwia generowanie transbłonowego gradientu jonowego i powstanie potencjału elektrochemicznego błony, będącego siłą napędową do syntezy ATP. Dlatego też integralność mitochondriów dotyczy szczelności wewnętrznej błony mitochondrialnej. Szczelność ta determinuje funkcje energetyczne mitochondriów. Ze względu na swoją wysoką selektywną przepuszczalność, błona wewnętrzna jest wyraźną barierą i powoduje powstanie odmiennych i molekularnie unikatowych kompartmentów.

Morfologia mitochondriów

Ultrastruktura mitochondriów w komórkach wykazujących wysoki poziom fosforylacji oksydacyjnej

Uzyskiwanie energii w komórkach, które wykazują duże zapotrzebowanie na ATP i mają niewielkie zapasy glikogenu na własne potrzeby, odbywa się dzięki utlenianiu substratów energetycznych (węglowodanów, kwasów tłuszczowych) w obecności tlenu. Dostarcza ono więcej ATP niż beztlenowe spalanie glukozy, dlatego w tym przypadku mitochondrialna fosforylacja oksydacyjna, obok glikoli-

tycznej fosforylacji substratowej i tej występującej w cyklu Krebsa, jest głównym źródłem ATP.

KLINIKA

Należy zwrócić uwagę, że to duże zapotrzebowanie na energię pochodzącą z tlenowego spalania substratów jest przyczyną **wrażliwości tych komórek na stres tlenowy**. Taka sytuacja występuje w **komórkach mięśnia sercowego**, gdzie energia jest niezbędna do ciągłego skurczu.

W miocytach serca obserwuje się wiele dużych i bardzo wydłużonych mitochondriów (nitkowate mitochondria), z silnie pofałdowaną wewnętrzną błoną, tworzącą blaszkowate grzebienie i ciemną matriks mitochondrialną (konfiguracja skondensowana). To silne pofałdowanie błony, zwiększające jej powierzchnię, jest związane z intensywnym transportem elektronów wzdłuż łańcucha oddechowego i fosforylacją oksydacyjną odbywającą się właśnie w obrębie wewnętrznej błony mitochondrialnej (ryc. 9.1, ryc. 9.3).

Podobną ultrastrukturę mitochondriów, z dużą liczbą grzebieni mitochondrialnych, wykazują komórki nabłonkowe, które są zaangażowane w aktywny transport metabolitów i jonów, wymagający ATP (np. komórki nabłonka jelitowego, komórki kanalików proksymalnych nerek, komórki okładzinowe gruczołów właściwych dna żołądka). Innymi komórkami, które wykazują wysoki poziom fosforylacji oksydacyjnej, są komórki nerwowe i niektóre komórki tkanki glejowej (komórki Schwana i oligodendrocyty). Duże zapotrzebowanie komórek nerwowych na energię jest związane z przewodnictwem nerwowym, a także z ciągłą syntezą i regeneracją składników włókien nerwowych oraz tworzeniem nowych połączeń międzykomórkowych. Wymienione komórki glejowe energię wykorzystują do syntezy osłonki mielinowej.

Ultrastruktura mitochondriów w komórkach wykazujących niską aktywność metaboliczną

KLINIKA

Mitochondria komórek starzejących się i niezróżnicowanych, a także niektórych komórek nowotworowych, charakteryzują się niewielką liczbą grzebieni mitochondrialnych i niską gęstością elektronową matriks mitochondrialnej.

Taki opis morfologiczny mitochondriów odpowiada stanowi spoczynkowemu tych organelli (konfiguracja ortodoksyjna), w którym następuje obniżenie poziomu fosforylacji oksydacyjnej ze względu na małe zapotrzebowanie na ATP.

Funkcja komórki a morfologia mitochondriów

Zupełnie odmienną ultrastrukturę mitochondriów mają **komórki zaangażowane w syntezę hormonów steroidowych** (komórki steroidogenne). Niektóre etapy syntezy tych hormonów odbywają się w mitochondriach (tab. 9.1). Komórki te zawierają duże ilości cewkowatych (tubularnych) mitochondriów, które swą nazwę zawdzięczają swoistej ultrastrukturze licznych grzebieni mitochondrialnych, mających kształt cewek. Tak charakterystyczne mitochondria występują np. w komórkach kory nadnerczy, Leydiga, pęcherzyka jajnikowego, ciałka żółtego.

Brunatna tkanka tłuszczowa (wielopęcherzykowa), występująca u noworodków ssaków, także ludzkich, charakteryzuje się dużą ilością okrągłych mitochondriów z gęsto ułożonymi grzebieniami i znaczną zawartością cytochromów. Ilość syntazy ATP jest natomiast uderzająco mała, co wynika z faktu, że główną funkcją mitochondriów tej tkanki jest wytwarzanie ciepła. Polega to na przekształcaniu energii uwalnianej podczas transportu elektronów przez łańcuch oddechowy w ciepło. Wytworzenie ciepła umożliwia specjalne białko rozprzęgające – **termogenina** (UCP-1, ang. *uncoupling protein*), znajdująca się w wewnętrznej błonie mitochondrialnej adipocytów.

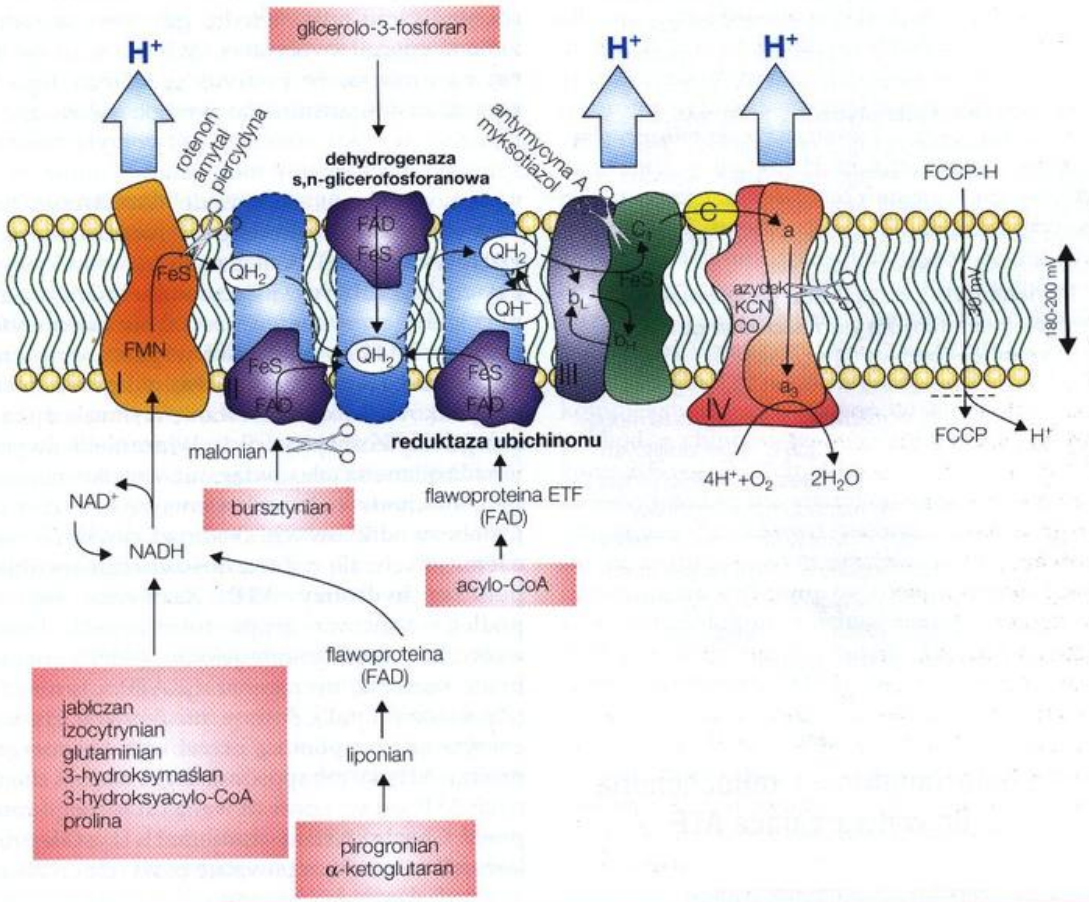
W plemnikach występują mitochondria morfologicznie nieco odmienne od mitochondriów występujących w komórkach somatycznych. Mają kształt wydłużony i zakrzywiony oraz liczne grzebienie mitochondrialne, które są ciasno upakowane w obrębie matriks. Łączą się nawzajem swoimi końcami i okręcają się wokół osi witki plemnika, tworząc wysoce uporządkowaną, unikatową spiralę mitochondrialną, która może być pojedyncza, podwójna, potrójna lub jeszcze bardziej złożona, w zależności od gatunku. Spiralnie połączone mitochondria łączą się ponadto ze sobą swoimi powierzchniami bocznymi, tworząc osłonkę mitochondrialną, funkcjonującą jako jedno organellum we wstawce. Połączenie mitochondriów uniemożliwia ich przemieszczanie się, zapewnia im oporność i sprzyja ich wzajemnej kooperacji. Umożliwia to stały i nieprzerwany dopływ energii do plemnika, którego ruchliwość ma decydujące znaczenie dla zapłodnienia komórki jajowej.

Uszkodzenia mitochondriów

KLINIKA

Obrzmienie (pęcznienie), czyli wakuolizacja mitochondriów, prowadzi do powiększenia organelli wskutek nagromadzenia wody, zwłaszcza w przestrzeni wewnątrz grzebieni. Zmianom tym towarzyszy przejaśnienie i zanik matriks mitochondrialnej, dezintegracja grzebieni mitochondrialnych (ryc. 9.2 b, c), ich peryferyczne ułożenie i przerwanie błon mitochondrialnych. Takie zmiany mogą występować w przypadku działania czynników toksycznych, zakażeń wirusowych (*herpes virus*) lub niedotlenienia.

Tworzenie różnorodnych struktur mielinopodobnych w obrębie mitochondriów z jednoczesnym zanikiem grzebieni i matriks mitochondrialnej jest



Rycina 9.3 Lokalizacja i budowa kompleksów (I–IV) łańcucha oddechowego w wewnętrznej błonie mitochondrialnej. Strzałki wskazują przebieg elektronów wzdłuż łańcucha oddechowego oraz miejsca wejścia substratów i inhibitorów do łańcucha oddechowego; kompleksy I, III i IV są pompami protonowymi odpowiedzialnymi za powstawanie różnicy stężeń H^+ po obu stronach błony (ΔpH), co przyczynia się do powstania transbłonowego potencjału ($\Delta\psi$, 180–200 mV), ΔpH i $\Delta\psi$ tworzą siłę protonomotoryczną (Δp); kompleksy te są również miejscami sprzężenia transportu elektronów z fosforylacją oksydacyjną; FCCP (karbonylcyjanek-p-trifluorometoksyfenylohydrazon – rozprzęgacz mitochondrialny), wprowadzając H^+ do matriks mitochondrialnej, znosi gradient protonowy, powoduje depolaryzację błony i doprowadza do spadku potencjału i obniżenia siły protonomotorycznej; rotenon, amytal, pierycydyna – inhibitory kompleksu I; malonian – inhibitor kompetycyjny kompleksu II i jednocześnie dehydrogenazy bursztynianowej, która przez FAD jest trwale związana z kompleksem II; antymycyna A, myksotiazol – inhibitory kompleksu III; azydek, KCN, CO – inhibitory kompleksu IV; a, a_3, b_L, b_H, c, c_1 – cytochromy; QH_2 – ubichinol – zredukowana forma ubichinonu (koenzymu Q), QH^- – anion semichinonowy zawierający tylko jeden elektron; koenzym Q jest miejscem rozdzielenia dwuelektronowej drogi transportu elektronów na jednoelektronową; FeS – centra żelazosiarkowe; FMN, FAD, FeS, cytochromy są centrami oksydoredukcyjnymi w poszczególnych kompleksach; ETF (*electron transferring flavoprotein*) – flawoproteina przenosząca elektrony; kompleks II, reduktaza ubichinonu, dehydrogenaza glicerofosforanowa są białkami transbłonowymi (linia przerywana)

wyrazem starzenia się organelli, ich degeneracji lub też ich uszkodzenia przez czynniki toksyczne (ryc. 9.2 b, c).

Hipertrofia – zwiększenie liczby i wielkości mitochondriów. Czasami mogą powstawać olbrzymie mitochondria (megamitochondria) z licznymi, często koncentrycznie i ciasno upakowanymi grzebieniami mitochondrialnymi oraz obecnością osmofilnych ziarnistości w obrębie matriks (miopatie włókien mięśni szkieletowych, martwica wątroby u alkoholików, deficyty pokarmowe, choroba degeneracyjna c.u.n., kardiomiopatie). Hipertrofię mitochondriów obserwuje się również w warunkach fizjologicznych (przerost błony endometrium macicy w czasie ciąży).

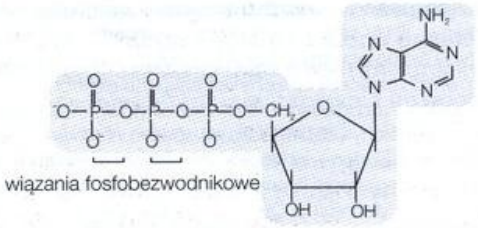
Mitochondria piknotyczne – małe, wykazujące dużą gęstość elektronową, z cechami regresji są wyrazem zaawansowanego uszkodzenia komórki (zmiany nieodwracalne), które może prowadzić do inwolucji i eliminacji mitochondriów. Takie zmiany obserwuje się w nekrozie komórek.

Mitochondria z dużą liczbą elektronowogęstych (osmofilnych) ziarnistości w obrębie matriks mitochondrialnej – pojawienie się tak zmienionych organelli jest wyrazem kalcyfikacji mitochondriów, np. w martwicy. Ziarnistości te mogą być otoczone błoną pochodzącą z degenerujących się błon mitochondrialnych. Obecność dużych ilości ziarnistości prowadzi do rozpadu mitochondriów. Stwierdza się je między innymi w komórkach mięśnia sercowego (w kardiomiopatii, w stanie eksperymentalnego niedotlenienia) i w wątrobie (w przypadku stosowania u zwierząt czterotlenku węgla, co prowadzi do martwicy hepatocytów).

Funkcja mitochondriów – mitochondria jako organelle wytwarzające ATP

ATP – uniwersalny przenośnik energii swobodnej w komórce

Liczba i różnorodność reakcji chemicznych składających się na metabolizm jest ogromna, a każdej z tych reakcji towarzyszą zmiany energii. Żywe organizmy podlegają tym samym prawom chemicznym i fizycznym co materia nieożywiona, dlatego też przemiany energetyczne zachodzące w komórkach rozważa się w kategoriach **termodynamicznych**. Tym, co wyróżnia żywe organizmy spośród pozostałych układów fizycznych, jest ich złożoność i genetycznie kontrolowany stan uporządkowania, podtrzymywany przez całe życie. Nie jest to sprzeczne z prawami termodynamiki, jeżeli traktuje się organizm jako układ otwarty, który stale wymienia z otoczeniem materię i energię z jednoczesnym ich przekształcaniem w formy dla siebie użyteczne. Taką najprzystępniejszą formą dla komórki pracującej w stałej temperaturze i pod stałym ciśnieniem jest **energia wiązań chemicznych** uzyskiwana z pożywienia. Termodynamiczną miarą zdolności układu do wykonania pracy w powyższych warunkach jest **energia swobodna, czyli energia Gibbsa (G)**. Reakcja może zachodzić spontanicznie tylko wtedy, gdy towarzysząca jej zmiana energii swobodnej (ΔG) ma wartość ujemną, co oznacza, że podczas przebiegu tego typu reakcji zostaje uwalniana energia swobodna. Organizmy w toku ewolucji wytworzyły niezwykle sprawne mechanizmy molekularne, umożliwiające wykorzystanie tej energii do napędzania reakcji niemogących zachodzić spontanicznie (ich ΔG ma wartość dodatnią). Najlepszym pośrednikiem między reakcjami wyzwalającymi energię a reakcjami pochłaniającymi energię okazał się **adenozynotrifosforan (ATP)** – uniwersalny przenośnik energii swobodnej. Zawiera on dwa wiązania fosfobezwodnikowe, których zerwanie wyzwala dużą ilość energii użytecznej (ryc. 9.4). Wiązania te zwyczajowo określane są jako „wiązania wysokoenergetyczne". Nie chodzi tu jednak o energię samych wiązań fosfobezwodnikowych, skądinąd zwykłych wiązań chemicznych, ale o **dużą ilość energii uwolnionej podczas hydrolizy ATP**. Zazwyczaj hydrolizie podlega końcowa grupa fosforanowa. Powstaje wówczas adenozynodifosforan (ADP), używany przez komórkę do regeneracji ATP, i ortofosforan (P_i), który po połączeniu z nieaktywną cząsteczką energizuje ją za pomocą przechwyconej energii hydrolizy ATP. W ten sposób energia wiązań chemicznych ATP jest wykorzystywana do różnego rodzaju pracy. Chociaż ATP zasila niemal wszystkie procesy komórkowe, to sam powstaje w wyniku reakcji ter-



Rycina 9.4 ATP przenosi energię chemiczną zawartą w wiązaniach fosfobezwodnikowych, łatwo hydrolizujących (wg B. Alberts).

modynamicznie niekorzystnej, przebiegającej kosztem energii uzyskanej podczas utleniania substancji pokarmowych (wieloetapowego ich rozdrabniania aż do poziomu elektronów). Prosta reakcja ADP + $P_i \rightarrow$ ATP może być zrealizowana dzięki złożonemu procesowi – **fosforylacji oksydacyjnej**, zachodzącej w wewnętrznej błonie mitochondrialnej. Istotą tego procesu jest wykorzystanie do syntezy ATP energii uwalnianej podczas transportu elektronów (pochodzących z cząsteczek pokarmowych) do O_2 przez wiele przenośników nazwanych **łańcuchem oddechowym**. Elektrony przenoszone przez łańcuch oddechowy pochodzą z bogatych energetycznie cząsteczek NADH i $FADH_2$, tworzonych podczas glikolizy, cyklu kwasu cytrynowego i utleniania kwasów tłuszczowych.

Budowa łańcucha oddechowego

Łańcuch oddechowy jest złożony z czterech kompleksów białkowych (ryc. 9.3). **Kompleks I (reduktaza NADH – koenzym Q lub dehydrogenaza NADH)** katalizuje przeniesienie dwóch elektronów z matriksowej puli NADH na ubichinon (koenzym Q). Jest to duże transbłonowe białko enzymatyczne zawierające ponad trzydzieści łańcuchów polipeptydowych. Elektrony z matriksowego NADH, który musi się przejściowo związać z enzymem, odbierane są przez grupę prostetyczną – mononukleotyd flawinowy (FMN) i przekazywane dalej na szereg centrów żelazosiarkowych typu [2Fe – 2S] i [4Fe – 4S]. Pierwszy rodzaj centrów składa się z dwóch atomów żelaza związanych koordynacyjnie z dwoma atomami siarki nieorganicznej, a drugi rodzaj z czterech atomów żelaza i czterech atomów siarki połączonych w taki sam sposób. Podczas wędrówki elektronów atomy żelaza przechodzą na zmianę od stanu Fe^{2+} (zredukowanego) do stanu Fe^{3+} (utlenionego) i odwrotnie.

Kompleks II (reduktaza bursztynian – koenzym Q, czyli dehydrogenaza bursztynianowa) składa się z kilku polipeptydów, z których dwa największe tworzą dehydrogenazę bursztynianową. Z pierwszym jest związany kowalencyjnie dinukleotyd flawino-adeninowy (FAD), który przyjmuje dwa elektrony pochodzące z utleniania bursztynianu do fumaranu w cyklu kwasu cytrynowego. Dehydrogenaza bursztynianowa, na stałe związana z błoną jako część kompleksu II, funkcjonuje więc jednocześnie jako jeden z enzymów cyklu kwasu cytrynowego. Elektrony z $FADH_2$ są odbierane i przenoszone dalej do ubichinonu przez centra żelazosiarkowe występujące w obu polipeptydach dehydrogenazy bursztynianowej.

Kompleks III (reduktaza cytochromowa albo reduktaza ubichinol-cytochrom c lub kompleks cytochromów bc_1) katalizuje przeniesienie elektronów z ubichinolu (QH_2) do cytochromu c. Zawiera cytochromy typu b (b_L i b_H) i c_1 oraz białka żelazosiarkowe typu 2Fe-2S. Różne cytochromy mają różne grupy hemowe, ale ich wspólną cechą jest centralnie położony atom żelaza, który przyjmując, a następnie oddając elektron, przechodzi ze stanu Fe^{3+} (utlenionego) do stanu Fe^{2+} (zredukowanego).

Kompleks IV (oksydaza cytochromowa) katalizuje przeniesienie elektronów z cytochromu c do O_2. W tym enzymie przenośnikami elektronów są dwa cytochromy typu a i dwa atomy miedzi. Cytochromy są takie same pod względem budowy, ale mają odmienne właściwości z powodu ich różnej lokalizacji w białku. Hem a położony jest bardzo blisko atomu miedzi nazwanego Cu_A, natomiast cytochrom a_3 tworzy parę z atomem miedzi Cu_B.

Poza wielkimi transbłonowymi kompleksami enzymatycznymi, w skład łańcucha oddechowego wchodzą dwa ruchome przenośniki elektronów: **ubichinon (koenzym Q)** i **cytochrom c** (ryc. 9.3). Ubichinon odbiera elektrony z kompleksu I albo kompleksu II i przenosi je na kompleks III. Jest pochodną chinonu, jego izoprenowy łańcuch złożony z 5-węglowych jednostek (u ssaków jest ich dziesięć) nadaje mu charakter silnie niepolarny, co umożliwia stosunkowo swobodne przemieszczanie się w hydrofobowym rdzeniu błony. Ubichinon odbiera dwa elektrony w reakcji dwustopniowej: pierwszy redukuje ubichinon do semiubichinonu (QH^-), a drugi do ubichinolu (QH_2). Pula ubichinonu i ubichinolu występuje w błonie w o wiele większym stężeniu molarnym niż inne składniki łańcucha oddechowego.

Ubichinon odbiera też elektrony z $FADH_2$ zawartego we flawoproteinach dwóch systemów enzymatycznych niezwiązanych strukturalnie bezpośrednio z łańcuchem oddechowym. Pierwszy system współpracuje z tzw. czółenkiem glicerolofosforanowym, umożliwiającym utlenianie cytoplazmatycznego NADH przez łańcuch oddechowy. Drugi system wykorzystuje β-oksydację kwasów tłuszczowych. Elektrony z $FADH_2$ są przekazywane do białka żelazosiarkowego, **reduktazy ubichinonu**, inaczej **oksydoreduktazy ETF – ubichinonu (flawoproteina przenosząca elektrony)**, a następnie przez ubichinon do łańcucha oddechowego.

Cytochrom c jest pojedynczym polipeptydem zlokalizowanym peryferycznie od zewnętrznej strony wewnętrznej błony mitochondrialnej (ryc. 9.3). Przenosi pojedyncze elektrony z kompleksu III na kom-

pleks IV z udziałem atomu żelaza grupy hemowej. Łańcuch polipeptydowy jest zwinięty w sposób zapewniający środowisko hydrofobowe umieszczonej wewnątrz grupie hemowej, a występujące na powierzchni skupiska ładunków dodatnich nadają białku charakter hydrofilowy. Dzięki tym ładunkom cytochrom c może dyfundować wzdłuż powierzchni błony i odbierając elektrony wiązać się przejściowo z kompleksem III, a oddając elektrony z kompleksem IV.

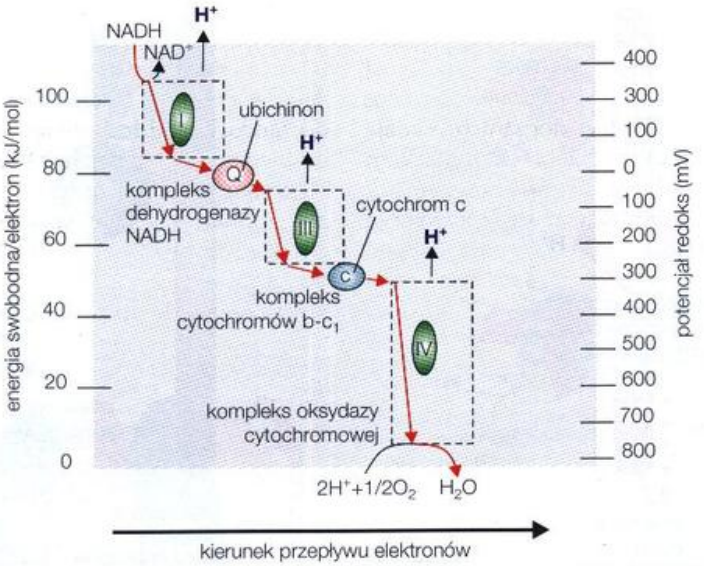
Potencjały oksydoredukcyjne (redoks)

Zgrupowane w czterech kompleksach oddechowych przenośniki elektronów – flawoproteiny (związane z FAD lub FMN), białka żelazosiarkowe, cytochromy i miedź związana z białkiem oraz funkcjonujące poza kompleksami ubichinon i cytochrom c – prowadzą elektrony ściśle wyznaczoną drogą. Kolejność poszczególnych przenośników zależy od ich **potencjałów oksydoredukcyjnych**, będących miarą powinowactwa cząsteczek do elektronów. Każda cząsteczka (a w przypadku łańcucha oddechowego każdy przenośnik) oddając elektron (y) staje się utleniona, a przyjmując elektron (y), staje się zredukowana. Na przykład NAD^+, odbierając elektrony z jabłczanu, przechodzi z formy utlenionej do zredukowanej, tj. NADH. NADH po oddaniu elektronów na ubichinon powraca do swojej formy utlenionej – NAD^+. W ten sposób powstaje **para oksydoredukcyjna**. Potencjał oksydoredukcyjny, wyrażany w woltach, określa różnicę napięcia między parami oksydoredukcyjnymi. W układzie pomiarowym punktem odniesienia dla badanych związków chemicznych jest wodór (przyjęto, że potencjał oksydoredukcyjny pary H^+–H_2 wynosi 0 mV). Ujemny potencjał oksydoredukcyjny oznacza, że dana substancja ma mniejsze powinowactwo do elektronów niż wodór, a potencjał dodatni świadczy o większym powinowactwie do elektronów. Silne **reduktory** (np. NADH) mają więc ujemny potencjał oksydoredukcyjny, a silne **utleniacze** (np. O_2) mają potencjał dodatni. Reakcja, w której utlenianie jednej cząsteczki prowadzi do redukcji innej cząsteczki, nazywa się **reakcją oksydoredukcyjną**. Łańcuch oddechowy to szereg właśnie takich reakcji, zaczynających się od pary oksydoredukcyjnej NAD^+/NADH (–320 mV), a kończących się parą ½ O_2/H_2O (+820 mV); różnica potencjałów wynosi 1,14 V (ryc. 9.5). Ułożenie przenośników kolejno według wzrastającego powinowactwa do elektronów decyduje o tym, że reakcja przeniesienia elektronów od NADH do O_2 jest termodynamicznie korzystna, a ilość uwalnianej energii znacznie przekracza ilość energii wymaganej do syntezy ATP.

Początkowe przeniesienie elektronów z matriksowych dehydrogenaz cyklu kwasu cytrynowego do łańcucha oddechowego wymaga zarówno odpowiedniego potencjału oksydoredukcyjnego pary substratowej, jak i odpowiedniej jej ruchliwości, aby mogła stanowić system wahadłowy między dehydrogenazami cyklu a łańcuchem. Tym warunkom odpowiada para NAD^+/NADH, która przenosi najwięcej elektronów. Dehydrogenaza bursztynianowa, dehydrogenaza glicerolo-3-fosforanowa i flawoproteina przenosząca elektrony katalizują natomiast odwodorowanie przy potencjale oksydoredukcyjnym bliskim 0 mV i dlatego nie redukują NAD^+, tylko jako enzymy błonowe oddają elektrony bezpośrednio na ubichinon.

Hipoteza chemiosmotyczna Mitchella; siła protonomotoryczna

Przez kilkadziesiąt lat badacze nie mogli odkryć mechanizmu sprzęgającego transport elektronów do O_2 z syntezą ATP, chociaż wiadomo było, że energia oksydoredukcyjna zostaje zachowana dzięki syntezie ATP. Przez analogię do znanej wtedy fosforylacji substratowej, zachodzącej w glikolizie i na jednym z etapów cyklu kwasu cytrynowego, poszukiwano „wysokoenergetycznych" intermediatów (białko, wiązanie, grupa chemiczna?) powstających w wyniku transportu elektronów, które mogłyby stanowić wspólny element przenoszący energię z kompleksów oddechowych na syntazę ATP. Tymczasem mechanizm sprzęgający okazał się radykalnie odmienny i zdumiewająco prosty. W 1961 r. Peter Mitchell przedstawił, szokującą jak na owe czasy, a dzisiaj powszechnie akceptowaną, **teorię chemiosmotyczną** opartą na założeniu, że czynnikiem sprzęgającym transport elektronów z syntezą ATP jest **gradient protonowy**, utworzony w poprzek wewnętrznej błony mitochondrialnej kosztem energii uwalnianej podczas wędrówki elektronów do O_2. Za sformułowanie tej hipotezy Mitchell został w 1978 r. uhonorowany Nagrodą Nobla. Okazało się, że przenoszące elektrony kompleksy I, III i IV są jednocześnie **pompami protonowymi**, a znaczna zmiana energii swobodnej (ΔG) obserwowana w trzech miejscach fosforylacyjnych, jest ich siłą napędową (ryc. 9.5). Energia uwalniana podczas dużego spadku potencjału oksydoredukcyjnego służy do oderwania H^+ z H_2O w matriks i wymuszenia na białku takiej **zmiany konformacyjnej**, która umożliwia przepompowanie tych protonów na cytoplazmatyczną stronę błony.



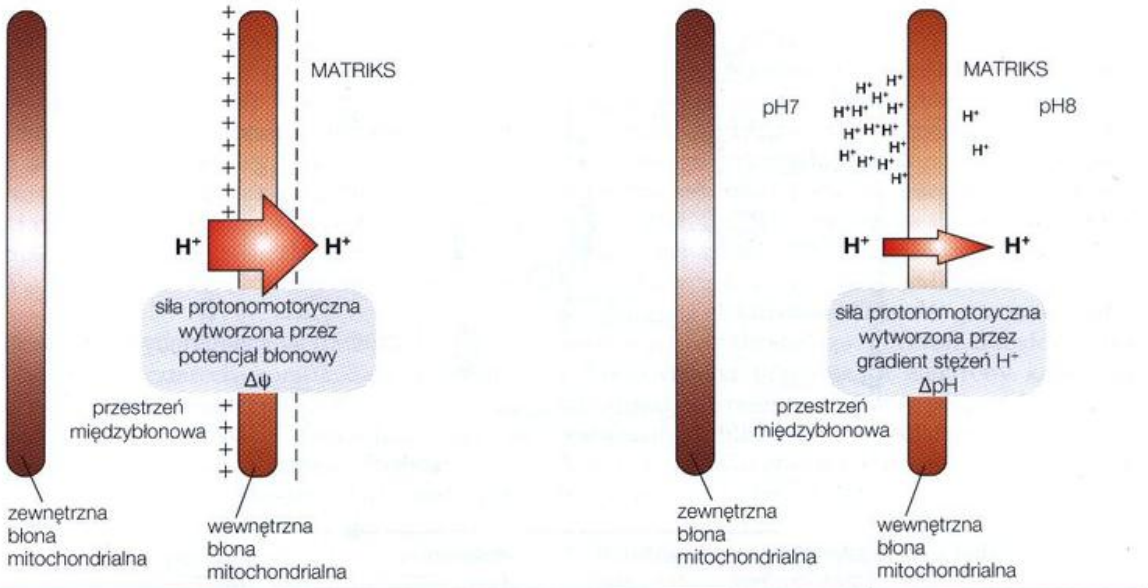
Rycina 9.5 Potencjał redoks wzrasta wzdłuż łańcucha transportu elektronów. Duży wzrost potencjału redoks pojawia się w obrębie każdego z trzech kompleksów enzymów oddechowych, co jest konieczne do pompowania przez nie protonów (wg B. Alberts).

Wszystkie trzy kompleksy oddechowe w błonie są ustawione tak, aby mogły pompować H^+ w tym samym kierunku (ryc. 9.3). Wynikiem pompowania H^+ z matriks jest powstanie gradientu ich stężenia w poprzek błony i różnicy pH między matriks (około 8) i przestrzenią międzybłonową (około 7) o prawie jedną jednostkę. Nierównomierne rozłożenie ładunków przy obu powierzchniach błony, wynikające z nagromadzenia jonów dodatnich (H^+) po stronie cytoplazmy podstawowej błony i jonów ujemnych (OH^-) po matriksowej stronie błony, prowadzi do powstania **potencjału błonowego**. Gradient stężeń H^+ (gradient chemiczny) o symbolu ΔpH i potencjał błonowy (potencjał elektryczny) o symbolu $\Delta\psi$ razem tworzą **siłę protonomotoryczną (Δp)** napędzającą syntezę ATP (ryc. 9.6).

Syntaza ATP

Z łańcuchem oddechowym współpracuje wielki kompleks białkowy wewnętrznej błony mitochondrialnej, **syntaza ATP**, który katalizuje fosforylację ADP do ATP (ryc. 9.1, ryc. 9.7 a). Ze względu na kluczową rolę w komórkowych procesach energetycznych, enzym ten jest bardzo konserwatywny; syntazy ATP różnych organizmów, od ssaków do bakterii, różnią się tylko pewnymi szczegółami budowy. Oglądane w mikroskopie elektronowym wyglądają jak „grzybki" wystające z błony w kierunku matriks. Wystającą część białka nazwano **F_1 (frakcja 1)**, a część zakotwiczoną w błonie – **F_0 (frakcja oligomycynowa)**. F_1 składa się z pięciu rodzajów podjednostek o stechiometrii $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\varepsilon$ (ryc. 9.7 a). Ułożone naprzemiennie podjednostki α i β (główka) zawierają **miejsca katalityczne** (ryc. 9.7 b). Podjednostki γ, δ i ε będące trzonem „grzybka" łączą F_1 z F_0. Zakotwiczona w błonie hydrofobowa część F_0 jest zbudowana z podjednostki *a*, dwóch podjednostek *b* i dziesięciu (u ssaków) podjednostek *c*. Pełni funkcję **kanału dla protonów** (ryc. 9.7 a).

Syntezę ATP napędzają H^+ przepływające przez syntazę ATP z powrotem do matriks. Do enzymu wchodzą przez kanał F_0. Według modelu konformacyjnego Boyera (Nagroda Nobla 1997) **mechanizm syntezy ATP polega na cyklu zmian powinowactwa miejsc katalitycznych w podjednostkach β do ADP i ATP** (ryc. 9.7 c). Te miejsca katalityczne, chociaż są identyczne, w każdym etapie cyklu mają odmienną konformację: **otwartą (O)** o znikomym powinowactwie do substratów; **luźną (L)** o słabym powinowactwie, bez aktywności katalitycznej; oraz **ścisłego związania (T)** o aktywności katalitycznej i silnym powinowactwie do produktu reakcji. Podstawą cyklu jest **kooperatywne** działanie podjednostek F_1. Dzięki temu procesowi indukowana przez H^+ zmiana konformacyjna powoduje przekształcenie stanu T z przyłączonym ATP w stan O, czemu towarzyszy uwolnienie ATP, a jednocześnie pobudza drugie miejsce o konformacji L (z luźno związanym ATP i P_i) do przejścia w stan T, w którym substraty te zostaną ściśle związane, co umoż-

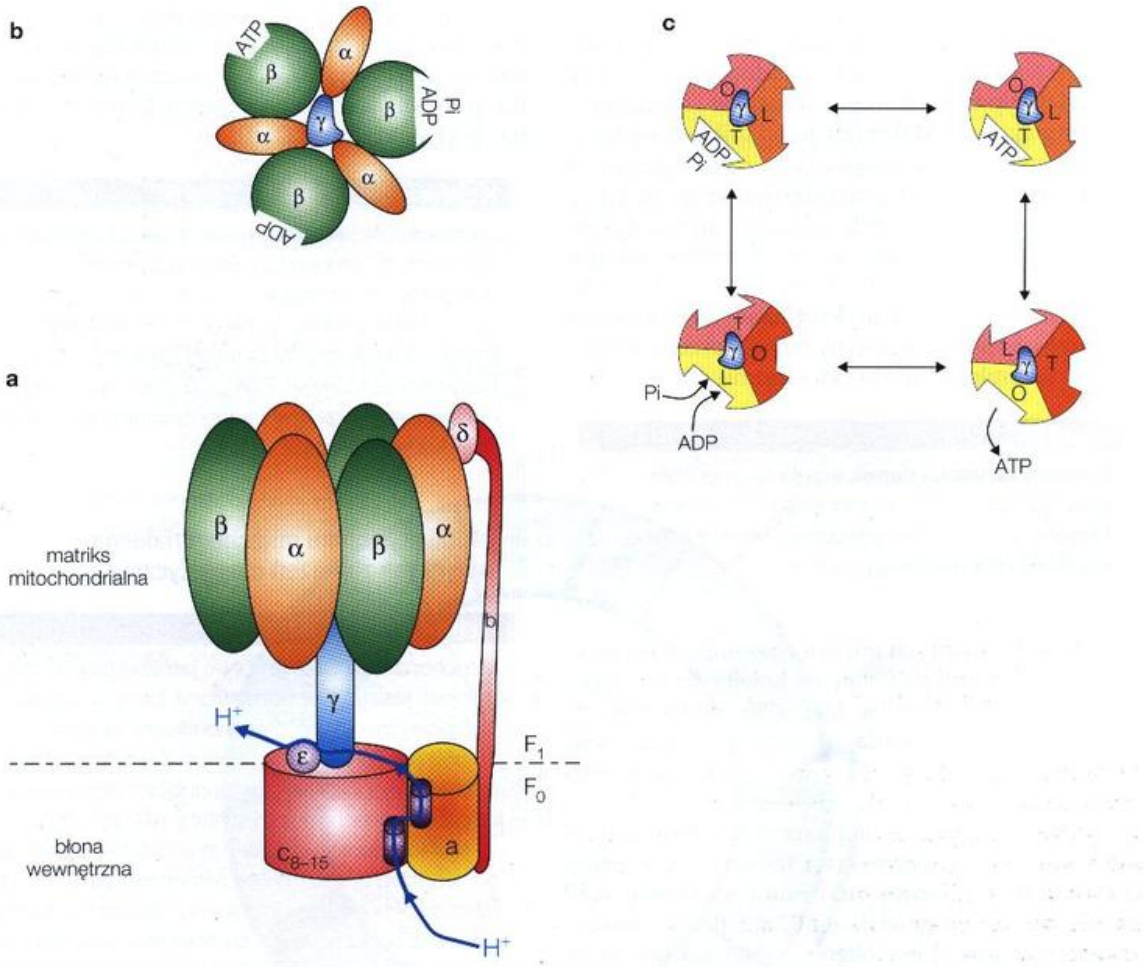


Rycina 9.6 Dwa składniki elektrochemicznego gradientu protonowego wytworzonego w poprzek wewnętrznej błony mitochondrialnej. Całkowity gradient elektrochemiczny H^+, istniejący w poprzek wewnętrznej błony mitochondrialnej, składa się z dużej siły wynikającej z potencjału błonowego i mniejszej siły wynikającej z gradientu stężeń H^+. Obie siły razem tworzą całkowitą siłę protonomotoryczną, która wywiera presję na powrót H^+ do matriks (wg B. Alberts).

liwia syntezę ATP. Każde z miejsc katalitycznych ma więc w każdej chwili odrębną konformację, ale wszystkie te miejsca przechodzą kolejno przez taką samą konformację. Boyer dowiódł, że **energia zachowana w gradiencie protonowym jest potrzebna nie do samej syntezy ATP, ale do oderwania zsyntetyzowanej już cząsteczki od centrum katalitycznego**, z którym jest ściśle związana w stanie T. Według najnowszego modelu powiązanie zmian konformacji trzech par podjednostek $\alpha\beta$ w części F_1 z przepływem H^+ przez F_0 następuje wskutek ruchu obrotowego określonych podjednostek enzymu względem innych. Syntaza ATP jest **motorem molekularnym** (ryc. 9.7 a); podjednostki *a*, *b*, δ oraz α i β składają się na część nieruchomą silnika – stojan, a wirnik jest zbudowany z podjednostek *c*, γ i ε. Protony przepływające przez półkanały umiejscowione na granicy podjednostek *a* i *c* generują moment obrotowy, przesuwający wirnik względem stojana. Moment ten musi mieć energię wystarczającą do wytworzenia 3 cząsteczek ATP na jeden pełny obrót wirnika. Osią wirnika jest długa asymetryczna podjednostka γ, która obracając się o 360° w trzech skokach po 120° „potrąca" poszczególne pary $\alpha\beta$, aby przekazać im energię, po czym wraca do pozycji centralnej i odchyla się od nowa (ryc. 9.7 b). Syntezę 1 cząsteczki ATP napędzają $3H^+$ przechodzące przez syntazę ATP. W czasie utleniania NADH są syntetyzowane 2,5 cząsteczki ATP na 2 elektrony przechodzące od NADH do O_2, podczas przeniesienia 2 elektronów z $FADH_2$ do O_2 powstaje natomiast 1,5 cząsteczki ATP.

Kontrola oddechowa i współczynnik kontroli oddechowej

Zapotrzebowanie komórki na ATP zmienia się w zależności od intensywności metabolizmu. Na przykład odpoczywający człowiek zużywa w ciągu doby około 40 kg ATP, a podczas wytężonego wysiłku może zużyć aż 0,5 kg w ciągu minuty. W wyniku szybkiego zużycia ATP zmniejsza się stosunek ATP/ /ADP+P_i, czyli **potencjał fosforylacyjny**. To oznacza, że komórka dysponuje zbyt małą ilością energii swobodnej dostępnej z ATP i dużym stężeniem substratów, z których powstaje ATP. Mechanizm zabezpieczający stałe dostarczanie ATP komórce przez mitochondria nazwano **kontrolą oddechową**, ponieważ polega na sprzężeniu szybkości oddychania z syntezą ATP. Duże stężenie ADP przyspiesza działanie syntazy ATP, co przyspiesza transport elektronów i zużycie O_2, zwiększa aktywność cyklu kwasu cytrynowego, a pośrednio glikolizy i rozpadu kwasów tłuszczowych. Podczas syntezy ATP pompy H^+ pracują bardzo aktywnie, ale wartość $\Delta\psi$ jest mała, ponieważ H^+ powracają do matriks przez syntazę ATP. Gdy cały ADP zostanie ufosforylowa-



Rycina 9.7 Syntaza ATP jako motor molekularny: **a**. struktura syntazy ATP; podjednostki zaliczone w modelu klasycznym do części F_0 oznaczono literami łacińskimi, a podjednostki należące do F_1 literami greckimi. W modelu przedstawiającym enzym jako motor molekularny podjednostki a, 2b, δ, γ_3, β_3 tworzą stojan, a podjednostki c, γ oraz ε – wirnik. H^+ przepływają przez półkanały na pograniczu podjednostek c i a; **b**. obrót podjednostek c zostaje przeniesiony na podjednostkę γ, która obracając się skokowo (3 × po 120°) umożliwia zmiany konformacyjne w podjednostce β; **c**. cykl trzech stanów konformacyjnych: otwarty (O), luźnego związania (L) i ścisłego związania (T).

ny do ATP, szybkość transportu elektronów maleje, a zatem i zużycie O_2, a $\Delta\psi$ osiąga dużą wartość (ok. 200 mV) z powodu zamknięcia drogi powrotnej dla H^+. **Duże stężenie ADP jest czynnikiem przyspieszającym transport elektronów, a tym samym fosforylację oksydacyjną, duże stężenie ATP działa na te procesy hamująco**. Prawidłowy przebieg kontroli oddechowej wymaga oczywiście sprawnie działającej translokazy ADP-ATP, nośnika wymieniającego ADP na ATP (ryc. 9.1).

Wskaźnikiem stosowanym do oceny stopnia sprzężenia utleniania substratów oddechowych przez łańcuch transportu elektronów z fosforylacją oksydacyjną jest **współczynnik kontroli oddechowej**. Jest to stosunek szybkości oddychania w obecności ADP (maksymalna synteza ATP) do szybkości oddychania w nieobecności ADP (brak syntezy ATP). Wartość tego współczynnika jest różna, co wynika z różnic w naturze mitochondriów. Wyższa wartość współczynnika kontroli oddechowej świadczy o lepszym sprzężeniu.

Inhibitory łańcucha oddechowego i fosforylacji oksydacyjnej

Znane są inhibitory wszystkich ważniejszych etapów przekształcania energii w mitochondriach. Można zahamować aktywność poszczególnych kompleksów łańcucha oddechowego, fosforylację

oksydacyjną i transport metabolitów lub jonów przez wewnętrzną błonę mitochondrialną. **Rotenon** (izoflawonoid, środek owadobójczy), **amytal** i **piericydyna A** hamują transport elektronów w kompleksie I. **Malonian** jest inhibitorem kompetycyjnym dehydrogenazy bursztynianowej (różni się od bursztynianu tylko jedną grupą CH_2). **Antymycyna** (antybiotyk z grupy antybiotyków polienowych, izolowany ze *Streptomyces*) hamuje drogę elektronu w obrębie kompleksu III na poziomie cytochromu b_H, a **myksotiazol** (otrzymywany z *Myxobacterium myxococcus fulvus*) przejście elektronu z kompleksu III do cytochromu c.

KLINIKA

Cyjanek, **azydek** i **tlenek węgla** hamują kompleks IV i uniemożliwiają redukcję O_2. Cyjanek i azydek reagują z formą żelazową hemu a_3, tlenek węgla z formą żelazawą (ryc. 9.3).

Odkrycie swoistych inhibitorów transportu elektronów pozwoliło na ustalenie kolejności występowania przenośników w łańcuchu oddechowym. Możliwość zatrzymania transportu elektronów w określonych miejscach wykorzystuje się w różnych technikach badawczych.

Fosforylację oksydacyjną można zahamować trzema sposobami. **Oligomycyna** (antybiotyk z grupy antybiotyków polienowych) hamuje syntezę ATP przez związanie się z białkiem OSCP (białko warunkujące wrażliwość na oligomycynę) umiejscowionym na styku F_0 z F_1, co uniemożliwia przepływ H^+ przez syntazę ATP. **Atraktylozyd**, **karboksyatraktylozyd** i **kwas bongkrekowy**, hamując aktywność translokazy nukleotydów adeninowych, blokują wymianę ADP/ATP. Trzeci sposób to przerwanie sprzężenia transportu elektronów z syntezą ATP przez aromatyczne związki lipofilne o charakterze słabych kwasów, zwane **rozprzęgaczami** lub **protonoforami**, zwiększającymi przewodnictwo protonowe błony. Rozprzęgacze w obecności Δp z łatwością przemieszczają się wahadłowo w dwuwarstwie lipidowej. W postaci zdeprotonowanej, dzięki ładunkowi ujemnemu dążą do dodatnio naładowanej powierzchni błony, gdzie wiążą H^+ i przenoszą go do ujemnie naładowanej matriks. Szybki transport elektronów i intensywne pompowanie H^+ nie napędza więc syntezy ATP, gdyż Δp zostaje rozproszona z powodu powrotu H^+ do matriks inną drogą niż syntaza ATP. Energia uwalniana podczas transportu elektronów zostaje przekształcona w ciepło (zob. też termogeneza). Klasycznym już rozprzęgaczem, znanym na długo przed sformułowaniem teorii chemiosmotycznej, jest 2,4-dinitrofenol (DNP). Obecnie najczęściej stosuje się **FCCP** (karbonylocyjanek-p-tri fluorometoksyfenylohydrazonu), który jest 100 razy bardziej aktywny od DNP.

KLINIKA

Jednakże DNP stosowany jest nadal jako składnik „cudownych" preparatów odchudzających, dostępnych w Internecie, co przy obecnej modzie na intensywne odchudzanie stanowi poważny problem zdrowotny. W Stanach Zjednoczonych Urząd Kontroli Leków, FDA (ang. *Food and Drug Administration*) zakazał terapeutycznego stosowania DNP już w 1938 roku!

Mutacje genomu mitochondrialnego przyczyną zaburzeń energetycznych

KLINIKA

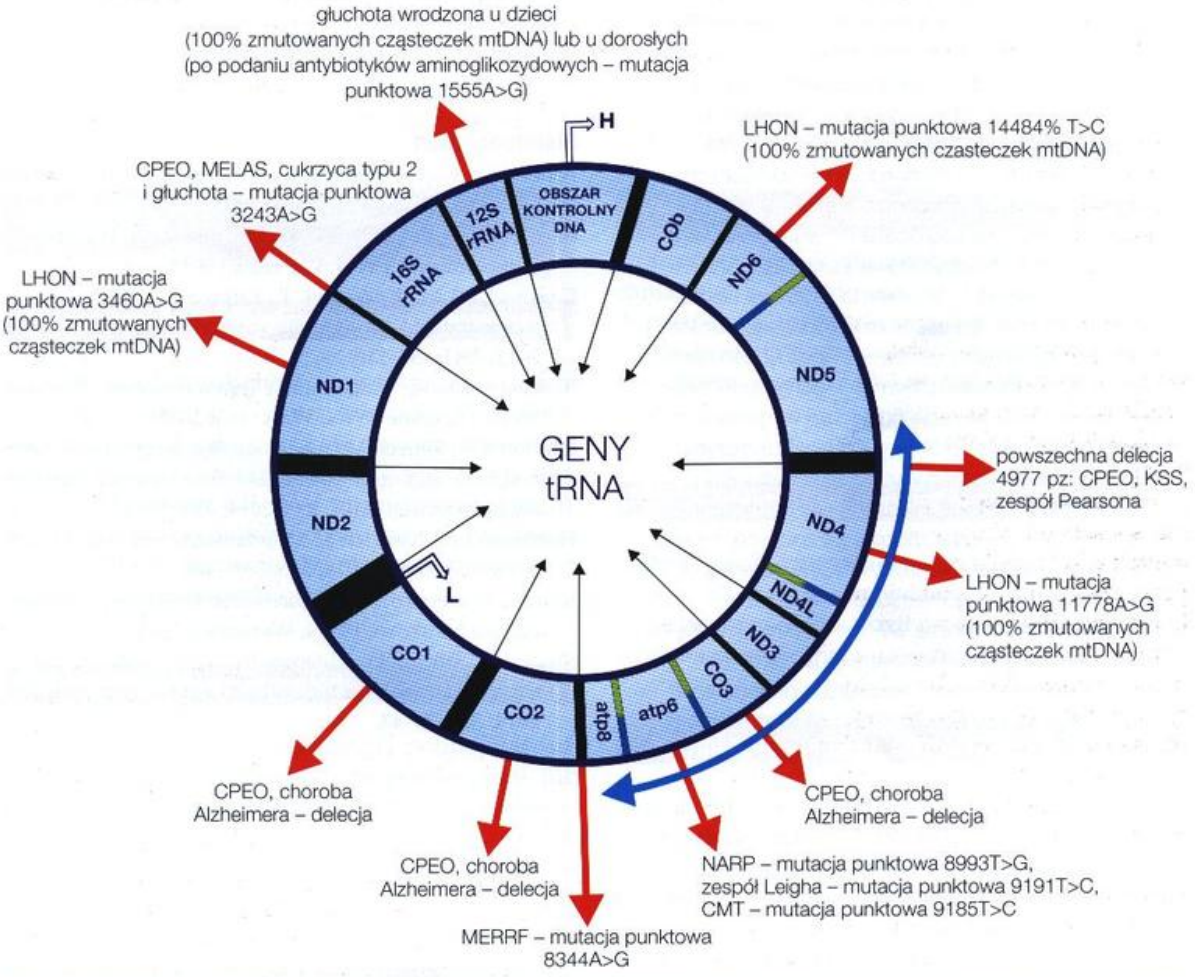
Mitochondrialny DNA (mtDNA) jest zbudowany z podwójnej, kolistej nici, pozbawionej intronów i białek histonowych. Genom mitochondrialny zawiera 16 569 par nukleotydów i koduje 2 rRNA, 22 tRNA oraz 13 z 67 polipeptydów budujących kompleksy łańcucha oddechowego i syntazę ATP (ryc. 9.8).

Mutacje punktowe i delecje w mtDNA prowadzą do zaburzeń syntezy białek mitochondrialnych w obrębie mitochondriów i transportu elektronów wzdłuż łańcucha oddechowego, co powoduje upośledzenie fosforylacji oksydacyjnej i funkcji energetycznej tych organelli. W konsekwencji uszkodzone mitochondria generują nadmiar reaktywnych form tlenu, które wtórnie mogą uszkadzać mtDNA, wrażliwy na działanie różnych czynników (np. promieniowanie, ksenobiotyki, toksyny metaboliczne, składniki dymu papierosowego), ze względu na brak białek histonowych, niską aktywność antyoksydacyjną tych organelli i brak w nich skutecznego procesu naprawczego materiału genetycznego. Procesy te prowadzą do apoptozy, stają się podstawą starzenia komórek, tkanek, narządów i chorób mitochondrialnych (np. występowanie delecji to często efekt starzenia).

W komórce koegzystują setki i tysiące niezmutowanych kopii mtDNA i takie, które zawierają patogenne mutacje oraz dopuszczalne zmiany polimorficzne (heteroplazmia), ponieważ nie wszystkie zmiany genomu powodują chorobę. Dlatego też kliniczna ekspresja zaburzeń mitochondrialnych, czyli **choroba mitochondrialna**, zależy od stosunku

patogennego mtDNA do prawidłowego, a także rodzaju tkanki, bowiem istnieje zmienna zawartość zmutowanych cząsteczek mtDNA pomiędzy tkankami. Zatem diagnostyka molekularna powinna być oparta na wyborze odpowiedniej tkanki do badania, ustaleniu ww. stosunku (przeważnie delecje dotyczą 60% cząsteczek DNA, z kolei mutacje w genach dla tRNA 95%) oraz powinna identyfikować mutacje zarówno w mtDNA, jak i w genomie jądrowym, gdyż choroba mitochondrialna może być efektem zmian w obu genomach.

Pamiętać należy, że dziecko dziedziczy mitochondrialne choroby genetyczne po matce, ponieważ mitochondria (w tym mtDNA) pochodzą z komórki jajowej (dziedziczenie uniparentalne). Podczas zapłodnienia plemnik wnika do cytoplazmy



Rycina 9.8 Mitochondrialny DNA (mtDNA) człowieka z zaznaczonymi genami dla 7 podjednostek reduktazy NADH – koenzymu Q, stanowiącej kompleksu I (geny ND 1, 2, 3, 4, 4L, 5, 6), dla apocytochromu b będącego integralną częścią reduktazy cytochromowej, czyli kompleksu III (gen COb), dla 3 podjednostek oksydazy cytochromowej – kompleks IV (geny CO1, 2, 3) i dla 2 podjednostek syntazy ATP (geny ATP 6, 8) oraz dla tRNA i rRNA; zakrzywione strzałki wskazują kierunek transkrypcji ciężkiej (H) i lekkiej (L) nici DNA; zaznaczono główne mutacje powodujące najbardziej znane choroby: CMT – neuropatia ruchowo-czuciowa, choroba Charcota-Marie'a-Tootha (ang. *Charcot-Marie-Tooth disease, hereditary motor and sensory neuropathy*); CPEO – zespół przewlekłej i postępującej zewnętrznej oftalmoplegii (ang. *chronic progressive external ophtalmoplegia*); LHON – dziedziczna neuropatia nerwu wzrokowego Lebera (ang. *Leber's hereditary optic neuropathy*); KSS – zespół Kearnsa-Sayre'a (ang. *Kearns-Sayre syndrome*); MELAS – encefalopatia, kwasica mleczanowa, występowanie incydentów podobnych do udarów (ang. *myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, stroke-like episodes*); MERRF – padaczka miokloniczna z występowaniem czerwonych poszarpanych włókien w mięśniach (ang. *myoclonic epilepsy and ragged red fibers*); NARP – neurogenna miopatia z ataksją i zwyrodnieniem barwnikowym siatkówki (ang. *neurogenic myopathy, ataxia, retinitis pigmentosa*).

komórki jajowej wraz ze wstawką zawierającą mitochondria. Eliminacja ojcowskiego mtDNA (proces autofagii) ma miejsce najprawdopodobniej na etapie 4-blastomerowego zarodka i jest procesem nie do końca wyjaśnionym. Wskazuje się, że usuwanie plemnikowych mitochondriów odbywa się dzięki ubikwitynacji i degradacji tych organelli w proteasomach. Można przypuszczać, że nieprawidłowości usuwania ojcowskich mitochondriów, wynikające z zaburzeń funkcji oocytu lub morfologicznych, jak i molekularnych zmian mitochondriów plemnika, mogą stać się przyczyną niepłodności partnerskiej.

Większość chorób mitochondrialnych to choroby należące do schorzeń neurologicznych i neurodegeneracyjnych, co jest uzasadnione ze względu na bezwzględną zależność neuronów od metabolizmu tlenowego. Do chorób spowodowanych mutacjami punktowymi genów strukturalnych należą: dziedziczna neuropatia nerwu wzrokowego Lebera, neuropatia obwodowa z ataksją i barwnikowym zwyrodnieniem siatkówki oraz zespół Leigha – śmiertelna choroba wieku dziecięcego (związana także z mutacją genu jądrowego kodującego kompleks II łańcucha oddechowego – dehydrogenazę bursztynianową). Mutacje punktowe w genach mitochondrialnego tRNA są natomiast przyczyną padaczki mioklonicznaj oraz encefalopatii mitochondrialnej z kwasicą mleczanową i napadami przypominającymi udar mózgu. Ze znanych chorób wywołanych delecjami mtDNA istotny jest zespół szpikowo-trzustkowy Pearsona – śmiertelny w niemowlęctwie. Można wyróżnić także choroby mitochondrialne spowodowane mutacjami mieszanymi: miopatia mitochondrialna – degeneracja mięśni objawiająca się słabością i nietolerowaniem wysiłku, cukrzyca nieinsulinozależna wraz z głuchotą (w tym przypadku zmiana w mtDNA prowadzi m. in. do upośledzenia glukosensoryczności komórek β trzustki lub ich zdolności do wydzielania insuliny), zespół Kearnsa-Sayre'a – wieloukładowe uszkodzenie neurologiczne z degeneracją siatkówki, blokiem serca, ataksją i demencją; stwierdza się także postępującą zewnętrzną oftalmoplegię i postępujące porażenie mięśni oka. Ponadto, uszkodzenia mtDNA są czynnikami etiologicznym choroby Alzheimera, Huntingtona, Parkinsona i stwardnienia zanikowego bocznego (ryc. 9.8).

Piśmiennictwo

Alberts B. i wsp.: *Podstawy biologii komórki*, Wydawnictwo Naukowe PWN. Warszawa 2007.

Berg J.M., Stryer L., Tymoczko J.L.: *Biochemia*. Wydawnictwo Naukowe PWN. Warszawa 2011.

Czarnecka A.M., Krawczyk T., Kukwa W.: *Zaburzenia mitochondrialne w procesie nowotworzenia*. Post. Biol. Kom. 2011; 38(1), 85–110.

Biologia – jedność i różnorodność (praca zbiorowa). Wydawnictwo Szkolne PWN. Warszawa 2008.

Dhillon V.S., Fenech M.: *Mutations that affect mitochondrial functions and their association with neurodegenerative diseases (review)*. Mut. Res. 2014, 759, 1–13.

Friedman J.R., Nunnari J.: *Mitochondrial form and function (review)*. Nature, 2014, 505, 335–343.

John L. Tymoczko i wsp.: *Biochemia, krótki kurs*. Wydawnictwo Naukowe PWN. Warszawa 2013.

Russell O., Turbull D.: *Mitochondrial DNA disease – molecular insights and potential routes to a curc*. Exp, Cell Rcs. 2014, 325, 38–43.

ROZDZIAŁ 10

Komunikacja międzykomórkowa – odbiór i przekazywanie sygnałów z udziałem receptorów

Jacek Malejczyk, Jolanta Godlewska-Jędrzejczyk

HASŁA

Informator pierwotny (ang. *first messenger*)

Czynnik fizyczny lub chemiczny, będący nośnikiem informacji odbieranej przez komórki. W czynnikach fizycznych informacja jest zakodowana w ich właściwościach i wskaźnikach fizycznych (np. długość, częstotliwość fali, ilość przenoszonej energii). W przypadku czynników chemicznych informacja jest zawarta w budowie chemicznej i konformacji przestrzennej cząsteczki.

Receptor (ang. *receptor*)

Cząsteczka chemiczna, najczęściej polipeptyd lub glikoproteina zlokalizowana na powierzchni lub wewnątrz komórki, związana z błonami komórkowymi lub występująca w cytoplazmie, zdolna do rozpoznawania, odbierania i przetwarzania informacji niesionej przez informator pierwotny.

Reakcja komórki (ang. *cell reaction*)

Określona zmiana właściwości lub zachowania się komórki w wyniku jej aktywacji za pośrednictwem specyficznego receptora. Przykładem może być depolaryzacja błony komórkowej, zmiana kształtu komórki, aktywacja lub zahamowanie określonego szlaku metabolicznego lub indukcja bądź zahamowanie ekspresji określonego genu.

Ligand (ang. *ligand*)

Cząsteczka chemiczna zdolna do swoistego wiązania się z receptorem, najczęściej w wyniku dopasowania przestrzennego i/lub wzajemnego oddziaływania fizykochemicznego (słabe wiązania wodorowe, jonowe i elektrostatyczne, siły van der Waalsa).

Agonista (ang. *agonist*)

Ligand zdolny do swoistego wiązania receptora i jego aktywacji, prowadzącej do przekazania i przetwarzania informacji przez komórkę oraz wywołania specyficznej reakcji komórki.

Antagonista (ang. *antagonist*)

Ligand zdolny do swoistego wiązania receptora, pozbawiony jednak właściwości do jego aktywacji. Antagonista swoiście konkuruje z agonistą o miejsce wiązania na receptorze i blokuje jego wiązanie, co powoduje zablokowanie funkcji receptora. W wyniku działania antagonisty nie dochodzi do wywołania reakcji komórki lub określona reakcja zostaje zahamowana.

Receptory jonotropowe (ang. *ionotropic receptors*)

Receptory, będące jednocześnie kanałami jonowymi. Związanie liganda (agonisty) powoduje zmiany konformacyjne receptora prowadzące do otwarcia

lub zamknięcia kanału i w wyniku tego do zmiany przepuszczalności błony komórkowej dla jonów i jej depolaryzację lub hiperpolaryzację.

Receptory metabotropowe (ang. *metabotropic receptors*)

Receptory wywołujące określony efekt biologiczny w wyniku regulacji (indukcji lub zahamowania) swoistych procesów metabolicznych lub modyfikacji białek strukturalnych. Zwyczajowo nazwę tę stosowano do receptorów dla hormonów i neuropeptydów przenoszących sygnał z udziałem heterotrimerycznych białek G.

Informator wtórny (ang. *second messenger*)

Związek chemiczny powstający dzięki aktywności enzymów aktywowanych w wyniku przeniesienia informacji przez receptor do wnętrza komórki. Informatory wtórne pełnią funkcje bezpośrednich lub pośrednich aktywatorów kinaz i fosfataz serynowo-treoninowych. Typowymi informatorami wtórnymi są: cykliczne nukleotydy, pochodne fosfolipidów błonowych oraz jony wapnia.

Białka G (ang. *G proteins*)

Rodzina małych białek mających zdolność do wiązania i hydrolizy GTP. Białka G są aktywatorami wielu przemian komórkowych, w tym aktywatorami wielu enzymów i elementów cytoszkieletu oraz uczestniczą w transporcie wewnątrzkomórkowym. Tak zwane heterotrimeryczne białka G, zbudowane z podjednostek α (właściwe białko G), β i γ, są czynnikami przenoszącymi sygnał od receptorów dla hormonów i neuropeptydów i aktywującymi enzymy syntetyzujące informatory wtórne. Innym przykładem białek G związanych bezpośrednio z przekazywaniem sygnałów przez receptory są białka RAS inicjujące szlak kinaz MAP, główny szlak aktywujący przemiany związane z cyklem komórkowym.

Białka adaptorowe (ang. *adaptor proteins*)

Białka niemające własnej aktywności enzymatycznej, wiążące się do cytoplazmatycznych domen receptorów i pośredniczące w przeniesieniu sygnału od receptorów. Białka adaptorowe są najczęściej rodzajem łącznika między niektórymi receptorami (np. receptorami dla niektórych cytokin i receptorami komórek układu immunologicznego) a systemami enzymatycznymi komórki.

Kinazy i fosfatazy białkowe (ang. *protein kinases/phosphatases*)

Enzymy zdolne do fosforylacji lub defosforylacji reszt serynowych i treoninowych (kinazy/fosfatazy serynowo-treoninowe) lub tyrozynowych (kinazy/fosfatazy tyrozynowe) białek. Procesy fosforylacji lub defosforylacji białek są jednym z głównych mechanizmów aktywacji lub inaktywacji wielu białek komórkowych (w tym białek strukturalnych, enzymów, czynników transkrypcyjnych) i decydują tym samym o wystąpieniu efektu biologicznego i w konsekwencji, o funkcjach komórki. W przypadku receptorów dla cytokin i cząsteczek regulujących odpowiedź immunologiczną kinazy i fosfatazy białkowe pełnią również funkcje czynników przenoszących sygnał do wnętrza komórki.

Czynniki transkrypcyjne (ang. *transcription factors*)

Czynniki białkowe wiążące się do swoistych sekwencji DNA w odcinkach regulatorowych (promotorach) genów i modulujące proces transkrypcji genu (syntezy swoistego RNA). Aktywacja swoistych czynników transkrypcyjnych jest warunkiem wystąpienia reakcji komórki na określoną informację odebraną przez receptor, szczególnie jeżeli reakcja ta wymaga pojawienia się nowych białek, wcześniej w komórce nieobecnych. W przypadku ligandów, takich jak: hormony steroidowe, hormony tarczycy, witaminy rozpuszczalne w tłuszczach lub niektóre pochodne lipidów, ich receptory są jednocześnie czynnikami transkrypcyjnymi (receptory jądrowe).

Synapsa elektryczna (ang. *electric synapse*)

Miejsce kontaktu komórkowego umożliwiające bezpośrednie, szybkie przekazywanie informacji za pomocą prądu jonowego. Tego rodzaju połączenia międzykomórkowe określa się mianem neksus.

Konekson (ang. *connexon*)

Kanał zbudowany z białek zwanych koneksynami, umożliwiający przekazywanie informacji między komórkami za pomocą prądu jonowego.

Synapsa chemiczna (ang. *chemical synapse*)

Miejsce kontaktu komórkowego, w którym dochodzi do przekazania informacji do komórki docelowej. Warunkiem przekazania informacji jest uwolnienie przez komórkę wysyłającą informację, tworzącą błonę presynaptyczną, substancji chemicznej (informatora pierwotnego) i jej reakcji z odpowiednim receptorem na błonie komórki docelowej (błonie postsynaptycznej). Przekazywanie informacji w ten sposób jest znacznie wolniejsze niż przez synapsę elektryczną. Należy jednak zaznaczyć, że pojęcie synapsy w ostatnich latach nie dotyczy już tylko synapsy nerwowej, ale podobnych połączeń między innymi rodzajami komórek, np. komórkami układu odpornościowego (synapsa immunologiczna).

Neurotransmiter (neuroprzekaźnik) (ang. *neurotransmitter*)

Związek chemiczny uwalniany z pęcherzyków synaptycznych części presynaptycznej synapsy nerwowej. Reagując ze swoistym receptorem, doprowadza do zmiany potencjału elektrycznego błony postsynaptycznej.

Neurotransmitery klasyczne (ang. *classical neurotransmitters*)

Związki chemiczne o niewielkiej cząsteczce, pochodne aminokwasów i amin. Enzymy konieczne do ich syntezy znajdują się zarówno w komórce (perikarion), jak i w zakończeniach presynaptycznych.

Neuropeptydy (ang. *neuropeptides*)

Peptydy lub białka syntetyzowane zarówno w neuronach (w obszarze perikarionu), jak i w innych komórkach organizmu. Związki o znacznie większej cząsteczce niż neurotransmitery klasyczne.

Synapsyna I

Białko umożliwiające związanie błon pęcherzyków synaptycznych z F-aktyną (białko cytoszkieletu). Aktywność wiązania jest kontrolowana przez proces fosforylacji synapsyny I.

Kompleks SNARE

Kompleks białek, których obecność stwierdza się zarówno w błonach pęcherzyków synaptycznych, jak i w błonie presynaptycznej, warunkujących kotwiczenie i fuzję pęcherzyków synaptycznych z błoną presynaptyczną i wydzielenie ich zawartości.

Komunikacja międzykomórkowa

Informatory pierwotne – sposób rozprowadzania w organizmie

Prawidłowe funkcjonowanie złożonych organizmów wielokomórkowych zależy od możliwości odbioru i przetwarzania informacji ze środowiska zewnętrznego oraz informacji wymienianej między poszczególnymi narządami i komórkami. Informacja może docierać do komórek w postaci różnych czynników fizycznych i chemicznych. Czynniki takie nazywa się **informatorami pierwotnymi** (ang. *first messengers*).

Informacja oraz sposób jej zakodowania zależą od charakteru informatora pierwotnego. W przypadku **czynników fizycznych** informacja jest najczęściej określona ilością oraz formą energii przekazywanej w postaci promieniowania świetlnego (widzialnego lub niewidzialnego), promieniowania termicznego, fal radiowych lub dźwięku o określonej częstotliwości i długości fali. W przypadku **czynników chemicznych** informacja jest zakodowana w budowie cząsteczek, a przede wszystkim w ich konformacji przestrzennej. Typowymi, naturalnymi informatorami pierwotnymi będącymi czynnikami chemicznymi są hormony: peptydowe, neuropeptydy, klasyczne neuroprzekaźniki, hormony steroidowe, cytokiny (czynniki wzrostu i różnicowania, hemopoetyny, interleukiny, interferony, neurotrofiny, chemokiny itp.), cząsteczki adhezji międzykomórkowej, eikozanoidy i inne pochodne kwasów tłuszczowych, niektóre witaminy oraz składniki macierzy pozakomórkowej.

Sposoby komunikacji międzykomórkowej w zależności od sposobu rozpowszechniania informacji

Sposób, w jaki informator pierwotny dociera do docelowego narządu, tkanki lub komórki, w dużym stopniu zależy od charakteru niesionej przez niego informacji i rodzaju komórek docelowych. Jeżeli informacja ma być dostępna dla wielu różnych komórek organizmu, istnieje konieczność jej dystrybucji ogólnoustrojowej, najlepiej za pośrednictwem układu krążenia. Ten sposób dystrybucji informacji nazywa się komunikacją **endokrynową** (ang. *endocrine communication*). Informatory pierwotne przenoszone drogą krwionośną wpływają na cały organizm i działają na komórki nawet bardzo odległe od miejsca wydzielania informatora. W tym systemie komunikacji każda komórka organizmu ma możliwość odebrać informacje pod warunkiem, że posiada specyficzne receptory. Tak więc w przypadku komunikacji endokrynowej informacja jest ogólnodostępna i jedynym ograniczeniem jest możliwość jej odbioru. Typowymi informatorami pierwotnymi, które są w ten sposób dystrybuowane, są hormony, neurohormony, niektóre witaminy itp. Hormony oraz niektóre witaminy są z reguły wytwarzane przez wyspecjalizowane grupy komórek tworzących gruczoły i wydzielane bezpośrednio do krążenia, skąd przechodzą do tkanek docelowych. System ten wymaga odpowiedniego zabezpieczenia informatora pierwotnego przed wpływem środowiska (np. przed proteolizą przez zawarte w osoczu enzymy). Zabezpieczenie to zapewniają swoiste białka transportujące, należące najczęściej do klasy albumin i globulin osoczowych.

Zadaniem wielu informatorów pierwotnych, takich jak: cytokiny, eikozanoidy i inne mediatory lokalne, jest **działanie miejscowe**. Zdolność do ich wytwarzania ma na ogół wiele różnych typów komórek z różnych tkanek. Ich receptory są również bardzo rozpowszechnione w wielu typach komórek i tkanek. Tego typu informatory są wydzielane i działają miejscowo, zwykle na ograniczoną liczbę najbliżej położonych komórek. Ich zasięg w dużym stopniu zależy od gradientu stężenia w tkance. Wydzielane w dużych ilościach, np. w stanach patologicznych, mogą przedostawać się do krążenia i wywierać efekty ogólnoustrojowe.

Szczególny typ komunikacji międzykomórkowej stanowi **przekaźnictwo synaptyczne** (ang. *synaptic communication*). W tym przypadku informacja jest przenoszona od jednej komórki do drugiej w sposób niezwykle wybiórczy dzięki wytwarzaniu **połączeń synaptycznych**. Budowa i funkcja synaps warunkują niezwykle precyzyjne i swoiste przekazanie sygnału: informator pierwotny jest uwalniany do przestrzeni pomiędzy błonami dwóch ściśle komunikujących się komórek (szczeliny synaptycznej) i dociera wyłącznie do określonego miejsca na błonie konkretnej komórki docelowej. Typowymi informatorami uczestniczącymi w przekaźnictwie synaptycznym są neurotransmitery (synapsy nerwowe i synapsy nerwowo-mięśniowe), niektóre cytokiny i cząsteczki adhezyjne (synapsy immunologiczne) oraz czynniki cytotoksyczne wydzielane w przebiegu zjawiska cytotoksyczności komórkowej.

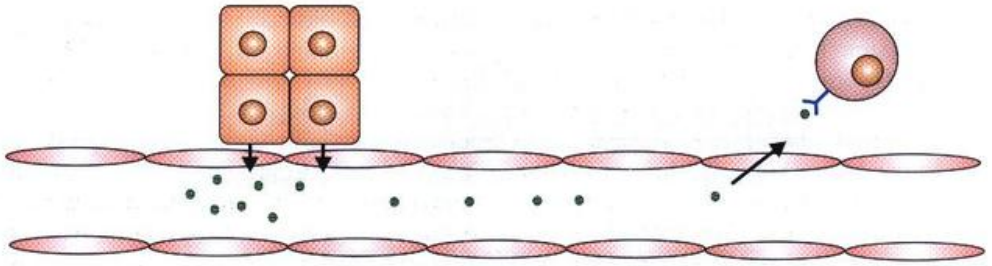
Jeszcze innym, najbardziej wybiórczym sposobem komunikacji międzykomórkowej, występującym na przykład w synapsach elektrycznych lub w połączeniach międzykomórkowych typu neksus, jest **połączenie metaboliczne**. Informacja przekazywana jest pomiędzy dwoma przylegającymi do siebie komórkami, których białka błonowe (koneksyny) tworzą wspólny kanał (konekson) umożliwiający bezpośrednie przechodzenie substancji (informacji) z cytoplazmy jednej komórki do drugiej. Nośnikiem informacji w tym przypadku są z reguły jony lub metabolity komórkowe.

Zestawienie i porównanie opisanych wyżej sposobów komunikacji międzykomórkowej przedstawiono na rycinie 10.1.

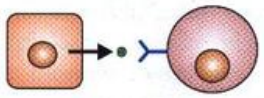
Sposoby komunikacji międzykomórkowej w zależności od pochodzenia informatora

Informator pierwotny wytwarzany przez określoną komórkę może działać na inne komórki lub zwrotnie na nią samą. Takie sposoby komunikacji międzykomórkowej nazywa się odpowiednio działaniem **parakrynowym** (ang. *paracrine communication*) i **autokrynowym** (ang. *autocrine communication*). Komunikacja parakrynowa lub autokrynowa związana jest z wydzielaniem rozpuszczalnych form informatora, który może docierać do komórki docelowej za pośrednictwem płynu tkankowego lub osocza krwi.

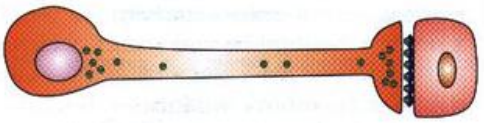
Szczególnym sposobem komunikacji jest tak zwane działanie **jukstakrynowe** (ang. *juxtacrine communication*). W tym przypadku informator pierwotny jest związany z błoną komórki przekazującej sygnał. Odbiór informacji następuje więc wyłącznie w wyniku bezpośredniego kontaktu z komórką docelową. Taki typ komunikacji dotyczy cząsteczek adhezji międzykomórkowej oraz niektórych cytokin (czynniki z rodziny TNF, EGF, *hedgehog*), które poza formą rozpuszczalną mogą również występować w formie związanej z błoną komórki wytwarzającej.



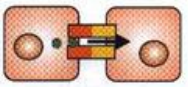
ENDOKRYNOWY (hormony peptydowe i steroidowe, neurohormony, witaminy)



LOKALNY (cytokiny, kininy, eikozanoidy)



SYNAPTYCZNY (neurotransmitery i cytokiny)



POŁĄCZENIE METABOLICZNE
(jony, metabolity)

Rycina 10.1 Sposób komunikowania się komórek w zależności od sposobu rozprzestrzeniania się i zasięgu sygnału.

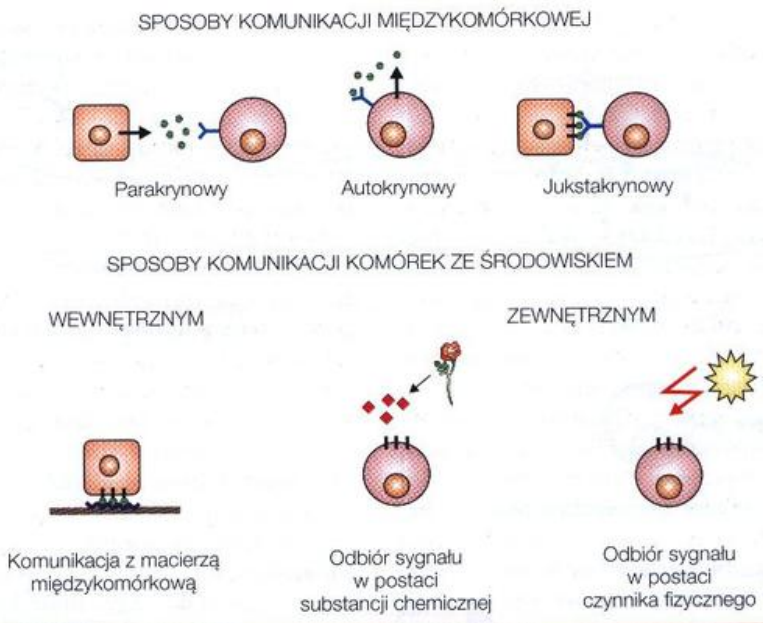
Komórki mogą także bezpośrednio odbierać informację nie tylko od innych komórek, ale również ze środowiska wewnętrznego i zewnętrznego organizmu. W tkance źródłem takiej informacji są np. nierozpuszczalne składniki substancji międzykomórkowej, takie jak kolagen, laminina, fibronektyna itp. Komórki rozpoznają składniki macierzy za pomocą swoistych cząsteczek adhezyjnych, głównie z rodziny integryn.

Ze środowiska zewnętrznego organizmu, poza wspomnianymi już czynnikami fizycznymi (światło, ciepło, dźwięk), docierają do komórek również sygnały chemiczne w postaci substancji gazowych, składników pożywienia i innych produktów otaczającej nas przyrody.

Wymienione sposoby komunikacji między komórkami oraz komórkami i środowiskiem są przedstawione na rycinie 10.2.

Receptory i rozpoznawanie informacji niesionej przez informatory pierwotne

Warunkiem odbioru informacji niesionej przez informator pierwotny jest obecność na powierzchni lub we wnętrzu komórek wyspecjalizowanych struktur komórkowych, receptorów. Budowa receptorów jest ściśle związana z rodzajem odbieranej informacji. Funkcje receptorów najczęściej pełnią glikoproteiny i polipeptydy, receptorami mogą być również cząsteczki oligosacharydów i glikolipidów. Receptory mogą być zbudowane z pojedynczych cząsteczek lub kompleksów składających się z dwu i więcej podjednostek. Cząsteczki receptorów dla informatorów pierwotnych, będących czynnikami fizycznymi, muszą zawierać fragmenty (domeny) zdolne do zmiany konformacji w wyniku swoistego pochłaniania energii lub pod wpływem ładunku elektrycznego. Przykładem mogą być fotoreceptory w siatkówce oka, gdzie białka receptorowe (opsyny) zawierają, będącą akceptorem energii świetlnej (fali elektromagnetycznej), pochodną kwasu retinowego lub niektóre receptory-kanały jonowe bramkowane napięciem. Z kolei funkcje receptorowe w przypadku działania na komórkę sił mechanicznych mogą pełnić elementy cytoszkieletu błonowego odkształcające się w przypadku ugięcia błony komórkowej. W przypadku informatorów pierwotnych, będących czynnikami chemicznymi, przekazywanie informacji polega na ich bezpośrednim wiązaniu się z receptorem.



Rycina 10.2 Sposoby komunikowania się komórek w zależności od pochodzenia informatora pierwotnego oraz rodzaje informacji odbierane ze środowiska zewnętrznego komórki.

Interakcje receptor–ligand

Czynniki (związki) chemiczne zdolne do swoistego wiązania się do określonych receptorów nazywa się **ligandami** (ang. *ligand*). Wiązanie to może być wynikiem słabych oddziaływań elektrostatycznych, jonowych bądź wodorowych lub sił van der Waalsa. Oddziaływania te są odpowiedzialne za stabilność kompleksu receptor-ligand. O swoistości i sile wiązania w głównym stopniu decydują jednak oddziaływania przestrzenne cząsteczek – zgodnie z zasadą dopasowania kształtu: jak klucz do zamka. Budowa przestrzenna domeny receptora wiążącej ligand odgrywa więc decydującą rolę i musi „pasować" do budowy przestrzennej ligandu. W niektórych przypadkach wiązanie liganda do receptora ma charakter stopniowego dopasowywania się obu cząsteczek w wyniku następujących po sobie zmian konformacyjnych, tak jak np. w zamku błyskawicznym.

Natura oraz budowa ligandu decyduje również o lokalizacji receptorów w komórce. Ligandy o dużej masie cząsteczkowej, które nie mogą być bezpośrednio przetransportowane do wnętrza komórki, wymagają zazwyczaj obecności receptorów zlokalizowanych w błonie zewnętrznej komórki i zawierających domenę wiążącą ligand od strony środowiska zewnętrznego. Receptory takie nazywa się **receptorami błonowymi** (ang. *cell membrane receptors*). Warunkiem zakotwiczenia receptora w błonie jest obecność jednej transbłonowej domeny hydrofobowej (bądź liku domen) lub jego bezpośrednie związanie, np. przez kowalencyjne wiązanie do fosfolipidów błonowych.

Receptory ligandów, które mogą bezpośrednio przenikać przez błonę do cytoplazmy lub są w niej produkowane, występują najczęściej wewnątrz komórki i dlatego nazywane są **receptorami wewnątrzkomórkowymi** (ang. *intracellular receptors*). Szczególną klasę stanowią receptory występujące w jądrze komórkowym, zwane **receptorami jądrowymi** (ang. *nuclear receptors*). W tym miejscu należy również wspomnieć, że istnieje w komórce zjawisko komunikacji wewnątrzkomórkowej, które służy do wymiany informacji pomiędzy poszczególnymi obszarami cytoplazmy i organellami. Biorą w nim udział swoiste receptory zlokalizowane na błonach pęcherzyków i innych organelli komórkowych. Opis tego układu wykracza jednak poza ramy niniejszego rozdziału.

Wiele różnych receptorów wykazuje duże podobieństwo pod względem ogólnej budowy, lokalizacji w komórce, a niekiedy również funkcji. Analiza ich sekwencji aminokwasowych często wskazuje na wspólne pochodzenie, co upoważnia do klasyfikowania ich do określonych rodzin. Przykładem mogą być omawiane w niniejszym rozdziale rodziny receptorów dla hormonów, neuropeptydów i neuroprzekaźników, różne rodziny receptorów

dla różnych typów cytokin (czynników wzrostu i różnicowania, interleukin, czynników hemopoetycznych, czynników z rodziny TNF itp.) oraz rodzina receptorów jądrowych. Należy również zaznaczyć, że istnieją też różne, zupełnie niespokrewnione receptory zdolne do wiązania i aktywowane przez ten sam ligand. Sugeruje to, że w przebiegu ewolucji niektóre receptory powstawały w wyniku zjawiska konwergencji genetycznej. Klasycznym przykładem tego zjawiska są receptory nikotynowy i muskarynowy dla acetylocholiny.

Tworzenie kompleksu receptor-ligand podlega prawom zbliżonym do praw warunkujących tworzenie kompleksów enzym-substrat, aminokwas--transporter błonowy (zob. s. 118) lub przeciwciało-antygen. Zjawisko to jest opisywane takimi wskaźnikami, jak: kinetyka wiązania oraz **stała dysocjacji** (*Kd*). Stała dysocjacji, zwana również **stałą powinowactwa**, opisuje siłę wiązania ligandu oraz stabilność kompleksu w określonych warunkach środowiska. Zależy ona od budowy i stopnia dopasowania obu cząsteczek i ich stosunku ilościowego oraz od warunków środowiska, takich jak: pH, siła jonowa lub temperatura. W zależności od wartości *Kd* wyróżnia się **receptory o wysokim** lub **niskim powinowactwie** do ligandu. Należy zatem podkreślić, że *Kd* zależy z jednej strony od budowy receptora i jego ligandu, zaś z drugiej od określonych warunków środowiska. Oznacza to, że nawet niewielka zmiana pH środowiska lub zmiana temperatury może mieć istotny wpływ na odbiór informacji i ostateczną reakcję komórki.

Celem odbioru informacji przez receptory jest jej swoiste rozpoznanie uwarunkowane związaniem ligandu oraz jej przetworzenie i indukcja właściwej reakcji komórki. Związanie ligandu lub odbiór informacji zawartej w informatorze pierwotnym o charakterze fizycznym (np. pochłonięcie odpowiedniej ilości energii) prowadzi na ogół do zmiany w strukturze receptora. Może to być **zmiana konformacji** cząsteczki receptora lub jego **oligomeryzacja**. Zmiany te prowadzą do **aktywacji receptora**, która jest warunkiem **przeniesienia** (**transdukcji**) informacji do wnętrza komórki, a następnie do inicjacji procesów fizykochemicznych lub biochemicznych prowadzących do wystąpienia określonej reakcji komórki.

Agoniści i antagoniści receptorów

Ligandy (informatory pierwotne) zdolne do aktywacji swoistego receptora nazywa się **agonistami** (ang. *agonist*). Ligandy, które wiążą się do receptora, ale nie są zdolne do jego aktywacji, nazywa się **antagonistami** (ang. *antagonist*). W zależności od stopnia powinowactwa antagoniści współzawodniczą z agonistami o wspólne miejsce wiązania na receptorze i, wypierając je, mogą swoiście blokować receptory (**antagoniści kompetycyjni**), a tym samym modulować zależne od receptorów reakcje komórkowe. Należy jednak zaznaczyć, że w wielu przypadkach miejsce wiązania antagonisty jest inne niż agonisty i jego efekt jest związany z pośrednim blokowaniem receptora w wyniku zmiany powinowactwa do agonisty. Na wiązanie ligandów oraz aktywację receptora może mieć również wpływ wiele różnych czynników modulujących, takich jak niektóre jony lub inne substancje chemiczne.

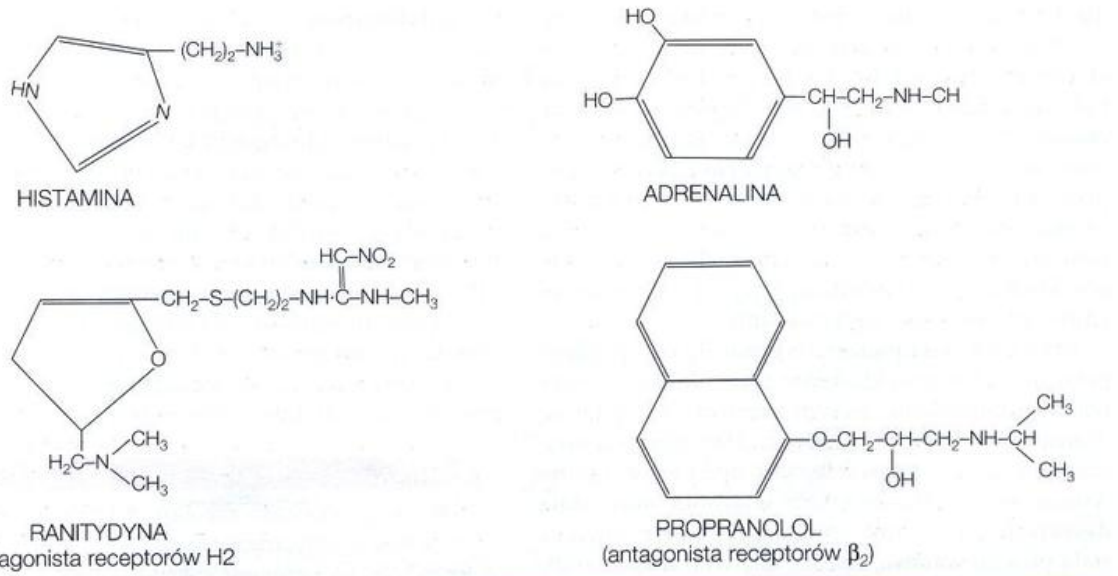
KLINIKA

Odkrycie antagonistów (naturalnych lub syntetycznych) oraz syntetycznych agonistów różnych receptorów stało się kamieniem milowym współczesnej medycyny. Znajdują one bowiem zastosowanie jako leki w wielu różnych chorobach, np. chorobach układu krążenia, zaburzeniach układu nerwowego lub odpornościowego. Przykłady znanych i szeroko stosowanych leków (antagonistów określonych receptorów) przedstawiono na rycinie 10.3.

Klasyfikacja receptorów w zależności od budowy i sposobu transdukcji sygnału

Komórki mogą reagować na odbierane informacje w sposób różnoraki. Reakcja taka może charakteryzować się: zmianą potencjału błonowego, metabolizmu (indukcją, zahamowaniem lub zmianą intensywności odpowiednich reakcji biochemicznych), fenotypu (różnicowanie), kształtu (skurcz), zdolności do migracji, proliferacji, aktywności wydzielniczej itp. Reakcje te w bezpośredni lub pośredni sposób zależą od budowy receptorów, sposobu transdukcji sygnału i uruchamianych mechanizmów efektorowych. Na tej podstawie receptory można podzielić na dwa zasadnicze rodzaje.

1. Receptory indukujące depolaryzację błony komórkowej w wyniku zmiany jej przepuszczalności dla jonów (**receptory jonotropowe**).
2. Receptory indukujące bezpośrednie lub pośrednie zmiany (aktywację lub zahamowanie) specyficznych szlaków metabolicznych (**receptory metabotropowe**).
   a. Receptory indukujące modyfikacje funkcji białek strukturalnych, co prowadzi np. do zmiany kształtu (skurczu) komórki.
   b. Receptory indukujące zmiany aktywności obecnych w komórce enzymów, co prowadzi



Rycina 10.3 Porównanie budowy histaminy i adrenaliny z ich antagonistami, które znalazły powszechne zastosowanie jako leki. Ranitydyna jest znanym lekiem hamującym nadmierne wytwarzanie kwasu solnego w żołądku występujące pod wpływem stymulacji komórek okładzinowych przez histaminę i będące przyczyną nadkwasoty i choroby wrzodowej. Propranolol jest natomiast stosowany w leczeniu nadciśnienia tętniczego i innych chorób układu krążenia. Za odkrycie tego związku oraz badania nad funkcjami receptorów sir James Black został uhonorowany w 1988 r. Nagrodą Nobla.

do zmiany produkcji przez komórkę określonych substancji lub wpływa na jej losy, np. w wyniku indukcji apoptozy.

c. Receptory indukujące zmiany aktywności genów przez zmianę aktywności czynników transkrypcyjnych. Zmiana aktywności transkrypcyjnej jest np. podłożem istotnych zmian prowadzących do zmiany fenotypu i różnicowania komórek.

Receptory jonotropowe (ang. *ionotropic receptors*)

Receptory pełniące jednocześnie funkcje kanałów jonowych są związane głównie z przekaźnictwem sygnałów w obrębie układu nerwowego. Po połączeniu z ligandem zmieniają swoją konformację, co powoduje zmianę swobodnego przepływu jonów, depolaryzację lub hiperpolaryzację błony komórkowej i powstanie potencjału czynnościowego. Czas od pobudzenia receptora do wystąpienia efektu biologicznego liczy się w milisekundach, jest to więc najszybszy i jednocześnie najprostszy system odbioru i przetwarzania informacji przez komórkę.

Klasyczne **receptory jonotropowe**, odpowiedzialne za przekaźnictwo synaptyczne, najczęściej są zbudowane z kilku różnych podjednostek tworzących heterooligomeryczne kompleksy, tworzące ściany kanału przechodzącego przez błonę komórkową. Typowymi przykładami są jonotropowe receptory dla acetylocholiny (receptor nikotynowy), kwasu γ-aminomasłowego (receptor $GABA_A$) lub kwasu glutaminowego (receptory NMDA, AMPA, kainowe). Po związaniu agonisty przez jedną lub więcej podjednostek (w przypadku receptora nikotynowego dla acetylocholiny są to dwie podjednostki α) dochodzi do zmiany konformacji całego kompleksu, otwarcia kanału i swobodnego przepływu jonów Na^+ i K^+. W mniejszym stopniu kanały te są również przepuszczalne dla jonów Ca^{2+}.

Interesującą formą receptorów tworzących kanały są również **purynergiczne receptory P_{2x}** i **P_{2z}**. Te ostatnie pod wpływem bardzo wysokich (milimolarnych) stężeń ATP formują nieselektywne megakanały umożliwiające swobodny wypływ z komórki wielu różnych substancji. Aktywacja tych kanałów prowadzi do utraty przez komórkę istotnych dla jej funkcjonowania metabolitów, zaburzenia funkcji, a nawet śmierci.

Kanały wapniowe

Osobną klasę receptorów jonotropowych, występujących w błonach zarówno zewnętrznych, jak i wewnętrznych komórek, są kanały wapniowe. Przykładem są występujące w błonie zewnętrznej **kanały wapniowe regulowane zmianą potencjału**

elektrycznego błony (ang. *voltage-gated channels*). W błonach siateczki gładkiej występują natomiast **receptory rianodynowe i receptory zależne od trifosforanu inozytolu (IP_3,** zob. s. 125, ryc. 6.23). W przeciwieństwie do opisanych wyżej, te receptory są zbudowane z jednego łańcucha polipeptydowego, którego domena transbłonowa tworzy selektywny kanał wapniowy.

Nazwa „receptory rianodynowe" pochodzi od rianodyny, roślinnego alkaloidu, który w niskim stężeniu otwiera kanał, a w wysokim zamyka go. Ten typ receptorów występujący w siateczce gładkiej włókien mięśni szkieletowych poprzecznie prążkowanych jest aktywowany przez bezpośrednią interakcję z innym, zależnym od potencjału elektrycznego, **receptorem dihydropirydynowym** obecnym w błonie kanalików T. Receptory rianodynowe, występujące w mięśniu sercowym, są aktywowane przez same jony Ca^{2+}, przechodzące do cytoplazmy ze środowiska zewnętrznego w wyniku otwarcia kanałów zależnych od potencjału elektrycznego.

Receptory zależne od IP_3 są aktywowane w wyniku interakcji z tą cząsteczką będącą produktem rozpadu fosfatydyloinozytolu katalizowanego przez fosfolipazy C. Ten szlak jest bezpośrednio związany z **receptorami metabotropowymi** (ang. *metabotropic receptors*) i został opisany dalej.

Biologiczna rola receptorów kanałów wapniowych jest ogromna. W przeciwieństwie do jonów Na^+ i K^+, których funkcja sprowadza się głównie do zmian potencjału czynnościowego komórki, wapń pełni w komórce wiele istotnych funkcji regulatorowych. Jest kofaktorem i aktywatorem wielu enzymów, na przykład ATP-az, warunkuje interakcje elementów cytoszkieletu i skurcz komórki oraz jest aktywatorem różnych kinaz i fosfataz białkowych (zob. niżej) uczestniczących w dalszych wewnątrzkomórkowych mechanizmach przekazywania sygnałów.

KLINIKA

Warto dodać, że funkcja receptorów zależnych od IP_3 jest silnie hamowana przez alkohol etylowy, co wyjaśnia zaburzenia koordynacji ruchowej w stanie upojenia alkoholowego.

Receptory związane z regulacją szlaków metabolicznych (receptory metabotropowe)

Aby zrozumieć istotę bardziej złożonej odpowiedzi komórki na odebraną informację, należy zwrócić uwagę na związki między systemami receptorowymi a podstawowymi mechanizmami regulującymi i warunkującymi wystąpienie różnych reakcji metabolicznych. Powszechnie wiadomo, że przebieg złożonych reakcji komórkowych zależy od występowania odpowiednich białek strukturalnych i regulatorowych oraz ich aktywacji. Tym samym, **mechanizmy warunkujące odbiór i przetwarzanie informacji (kaskady przekazywania sygnałów) muszą docelowo wpływać na aktywację lub inaktywację odpowiednich białek efektorowych i/lub ich syntezę.**

Rola kinaz i fosfataz białkowych (ang. protein kinases and phosphatases)

Istnieje wiele znanych mechanizmów bezpośrednio regulujących funkcje układów strukturalnych i enzymatycznych komórki. Obecnie wydaje się jednak, że najważniejszą rolę odgrywają procesy **fosforylacji** i **defosforylacji** białek katalizowane odpowiednio przez **kinazy** i **fosfatazy białkowe**. Ze względu na swoistość substratową **kinazy i fosfatazy białkowe dzieli się na serynowo-treoninowe i tyrozynowe**. Fosforylacja wymienionych wyżej reszt aminokwasowych może spowodować zmiany konformacyjne białka i doprowadzić do jego aktywacji lub inaktywacji. Efekt odwrotny można obserwować w przypadku jego defosforylacji. Wiadomo, że fosforylacja lub defosforylacja jest odpowiedzialna za aktywację lub inaktywację wielu enzymów komórkowych, białek strukturalnych (na przykład białek cytoszkieletu), czynników transkrypcyjnych oraz również samych receptorów (zob. niżej). Przykłady kilku wybranych substratów różnych typów kinaz i fosfataz białkowych oraz reakcji komórkowych związanych z ich fosforylacją lub defosforylacją przedstawiono w tabeli 10.1. Jak widać, kinazy lub fosfatazy białkowe mogą aktywować różne procesy komórkowe zarówno w wyniku bezpośredniej aktywacji określonych przemian metabolicznych, jak i pośrednio, inicjując ekspresję swoistych genów. Generalnie, kinazy/fosfatazy serynowo-treoninowe są odpowiedzialne za aktywację lub inaktywację enzymów lub czynników transkrypcyjnych. Natomiast kinazy/fosfatazy tyrozynowe są najczęściej związane z transdukcją sygnału przez błonę komórkową do cytoplazmy.

Nie ulega zatem wątpliwości, że **kinazy i fosfatazy białkowe są niezwykle istotnym pośrednim lub ostatecznym elementem w łańcuchu przekazywania i przetwarzania informacji**. Odkrycie roli kinaz białkowych w regulacji funkcji komórki zostało w 1992 r. uhonorowane Nagrodą Nobla dla Edwina G. Krebsa i Edmonda H. Fishera.

Tabela 10.1 Przykłady substratów różnych typów kinaz i fosfataz białkowych oraz reakcji komórki związanych z ich fosforylacją lub defosforylacją. Wybór substratów został dokonany w celu przedstawienia wpływu kinaz lub fosfataz na regulację różnych, niekiedy bardzo odmiennych, procesów biologicznych w komórce

Kinaza/fosfataza	Substrat	Reakcja komórki
Kinazy serynowo-treoninowe		
Kinaza kinazy fosforylazy glikogenowej (kinaza A)	kinaza fosforylazy glikogenowej	glikogenoliza
Kinaza CaM II (kinaza zależna od Ca^{2+}/kalmoduliny)	kinaza łańcuchów lekkich miozyny	inaktywacja kinazy → rozkurcz mięśni gładkich
PKCα (kinaza C)	białka kanałów jonowych	depolaryzacja błony
Końcowa kinaza Jun (kinaza zależna od ceramidów)	czynnik transkrypcyjny c-Jun	ekspresja swoistych genów → indukcja apoptozy
Kinaza będąca domeną cytoplazmatyczną receptorów dla TGF-β)	czynnik transkrypcyjny Smad3/4	ekspresja genu dla kolagenazy I
Kinazy tyrozynowe		
Kinaza będąca domeną cytoplazmatyczną receptorów dla cytokin z rodziny EGF	autofosforylacja	aktywacja białka Ras → stymulacja proliferacji komórki
Kinaza Jak	czynnik transkrypcyjny Stat1	ekspresja swoistych genów → zahamowanie ekspresji białek wirusowych
Fosfatazy serynowo-treoninowe		
Fosfataza białkowa 2B (PP2B, fosfataza zależna od Ca^{2+}/kalmoduliny)	czynnik transkrypcyjny NF-AT	ekspresja genu dla CD95
Fosfatazy tyrozynowe		
Receptorowa fosfataza tyrozynowa (CD45)	kinaza Lck	zahamowanie aktywności kinazy CD45

Rola czynników transkrypcyjnych (ang. transcription factors)

W wielu wypadkach określona reakcja biologiczna komórki na odebraną informację zależy od udziału nowego białka. W takiej sytuacji jest wymagana jego synteza w wyniku **aktywacji swoistego genu**. Ekspresja genu (transkrypcja) jest niezwykle złożonym mechanizmem uzależnionym od wielu różnych czynników, wśród których szczególną rolę przypisuje się **czynnikom transkrypcyjnym**. Czynniki transkrypcyjne są białkami zdolnymi do specyficznego rozpoznawania i wiązania swoistych sekwencji DNA zlokalizowanych w regionach regulatorowych genów, promotorach. Od ich związania zależy aktywacja polimerazy i synteza swoistego mRNA, a w dalszej kolejności pojawienie się swoistego białka i zmiana fenotypu komórki. **Czynniki transkrypcyjne mogą więc być ostatnimi strukturami docelowymi w łańcuchu przekazywania i przetwarzania informacji.**

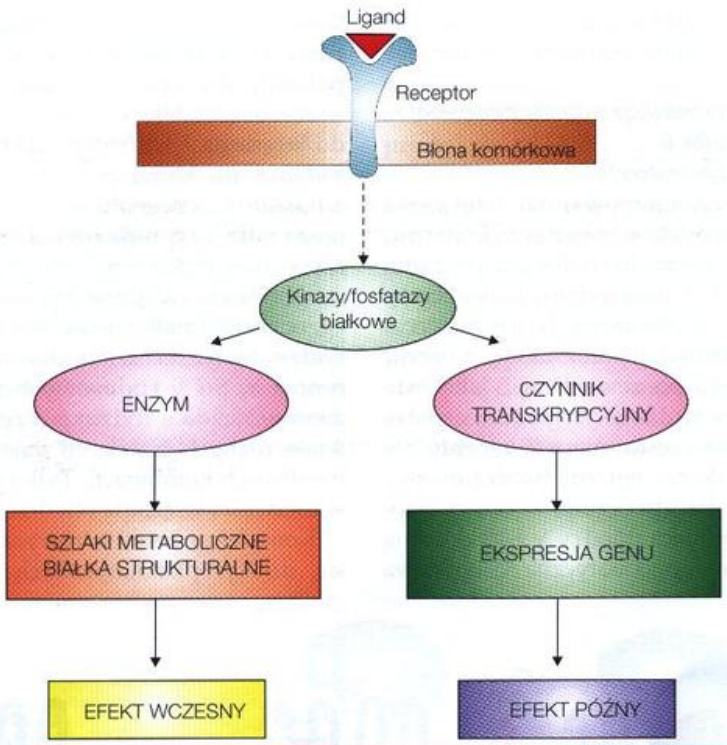
Aktywacja szlaków biochemicznych w komórce jest katalizowana głównie przez kinazy i fosfatazy serynowo-treoninowe. Kinazy i fosfatazy tyrozynowe w większości przypadków pełnią natomiast rolę w przenoszeniu sygnału przez błonę (zob. niżej). Na rycinie 10.4 przedstawiono kluczową pozycję kinaz/fosfataz serynowo-treoninowych oraz czynników transkrypcyjnych w kaskadzie przekazywania sygnałów.

Informatory wtórne jako aktywatory kinaz lub fosfataz białkowych

Aktywacja czynników transkrypcyjnych może zachodzić w wyniku ich fosforylacji lub defosforylacji. Aktywacja kinaz lub fosfataz serynowo-treoninowych, zwłaszcza tych związanych z komunikacją endokrynową, wymaga natomiast udziału swoistych czynników, nazywanych ze względu na ich miejsce w szlakach przekazywania sygnałów, **informatorami wtórnymi** (ang. *second messenger*). Różne rodziny kinaz i fosfataz serynowo-treoninowych są aktywowane przez różne informatory wtórne. Mogą nimi być **cykliczne nukleotydy, produkty przemian fosfolipidów** lub **sfingolipidów błonowych** oraz (o czym wspomniano już wcześniej) **jony wapnia**. Ich powstawanie w komórce jest wynikiem aktywności **swoistych enzymów** w rezultacie aktywacji **receptorów i transdukcji sygnału przez błonę**. Wykaz informatorów wtórnych, aktywowane przez nie rodzaje kinaz białkowych oraz enzymy odpowiedzialne za ich syntezę przedstawiono w tabeli 10.2.

Typy receptorów związanych z aktywacją układów enzymatycznych

Istnieją dwa zasadnicze mechanizmy przenoszenia sygnału przez błonę i aktywacji enzymów syntetyzujących informatory wtórne. Pierwszy mechanizm związany jest z aktywacją **heterotrimerycznych białek G** (ang. *heterotrimeric G proteins*), drugi zaś z akty-



Rycina 10.4 Centralne miejsce kinaz i fosfataz białkowych oraz czynników transkrypcyjnych w odbiorze sygnału od receptorów i aktywacji reakcji komórkowych.

Tabela 10.2 Główne informatory wtórne, syntetyzujące je enzymy oraz rodzaje aktywowanych kinaz lub fosfataz białkowych

Enzymy syntetyzujące informator wtórny	Substrat	Informator wtórny	Rodzaj kinazy
Cyklaza adenylanowa	ATP	cAMP	kinaza A
Cyklaza guanylanowa	GTP	cGMP	kinaza G
Fosfolipaza Cβ (PLCβ)	difosforan fosfatydyloinozytolu (PIP_2)	diacyloglicerol (DG)	kinaza Cα, β, γ
Fosfolipaza Cγ (PLCg)	PIP_2	DG	kinaza Cα, β, γ
Fosfolipaza D (PLD)	fosfatydylocholina	DG	kinaza Cα, β, γ
Fosfolipaza A (PLA)	fosfatydylocholina	kwas arachidonowy (AA)	kinaza Cα, β, γ
Kinaza 3-fosfatydyloinozytolu (PI-3K)	PIP_2	trifosforan fosfatydyloinozytolu (PIP_2)	kinaza Cζ
Kwaśna sfingomielinaza (A-SMaza)	sfingomielina	ceramidy	kinaza zależna od ceramidów (CAPK)
Obojętna sfingomielinaza (N-SMaza)	sfingomielina	ceramidy	fosfataza zależna od ceramidów (CAPP)
*	–	Ca^{2+}	kinaza zależna od Ca^{2+}/kalmoduliny (CaMA)
*	–	Ca^{2+}	fosfataza zależna od Ca^{2+}/kalmoduliny (CaMP)
Fosfodiesteraza cGMP (cGMP PDE)	cGMP	hydroliza cGMP do GMP	**

* Ca^{2+} może być uwalnialny z cystern siateczki gładkiej pod wpływem IP_3, który jest drugim obok DG produktem rozkładu PIP_2 przez PLC.

** cGMP jako informator wtórny nie aktywuje kinazy, jest natomiast agonistą kanałów jonowych w czopkach i pręcikach siatkówki. Jego rozkład powoduje zamknięcie kanałów, hiperpolaryzację błony i przekazanie impulsu nerwowego do mózgu.

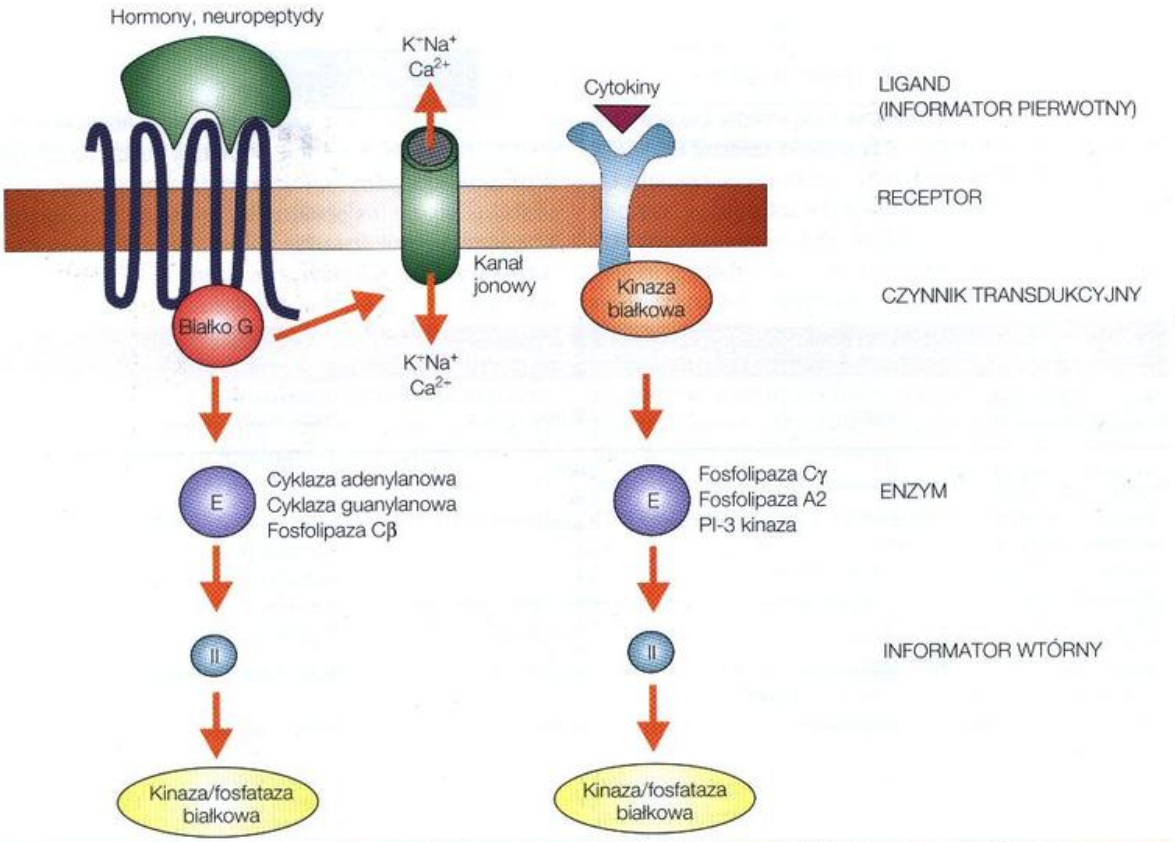
wacją **kinaz/fosfataz białkowych**. Porównanie tych dwóch systemów przedstawiono na rycinie 10.5.

Receptory związane z transdukcją sygnału z udziałem heterotrimerycznych białek G (ang. G protein-coupled receptors)

Ten typ receptorów jest typowy dla większości hormonów, neurohormonów, neurotransmiterów, chemokin, kinin oraz pochodnych kwasu arachidonowego. Należą one do jednej rodziny białek, mających siedem domen transbłonowych. Ich cząsteczka siedem razy przechodzi przez błonę, tworząc typowe pętle zarówno po zewnętrznej, jak i wewnętrznej stronie błony. Z tego względu receptory te określa się również często mianem **receptorów serpentynowych**. Pętle zewnętrzne tworzą miejsce wiązania ligandu. Pętla utworzona w części cytoplazmatycznej występująca między V i VI domeną transbłonową oraz cytoplazmatyczna C-końcowa domena tworzą natomiast miejsce wiązania **heterotrimerycznych białek G**, które są bezpośrednio odpowiedzialne za przeniesienie sygnału przez błonę.

Nazwa **białek G** pochodzi od ich zdolności do **wiązania i hydrolizy GTP** do **GDP**. Są liczną rodziną, do której poza białkami G związanymi z transdukcją sygnału przez błonę zalicza się również białka G z rodziny Ras związane z transdukcją sygnału przez receptory dla czynników wzrostu oraz białka G związane z cytoszkieletem i endo- lub egzocytozą (białka Rho, Rac, Rab). Heterotrimeryczne białka G są zbudowane z trzech podjednostek α, β i γ kodowanych przez różne rodziny genów. Każda z rodzin jest reprezentowana przez wiele różnych białek, co daje bardzo dużą liczbę możliwych kombinacji. Tylko podjednostki α mają właściwości wiązania i hydrolizy GTP.

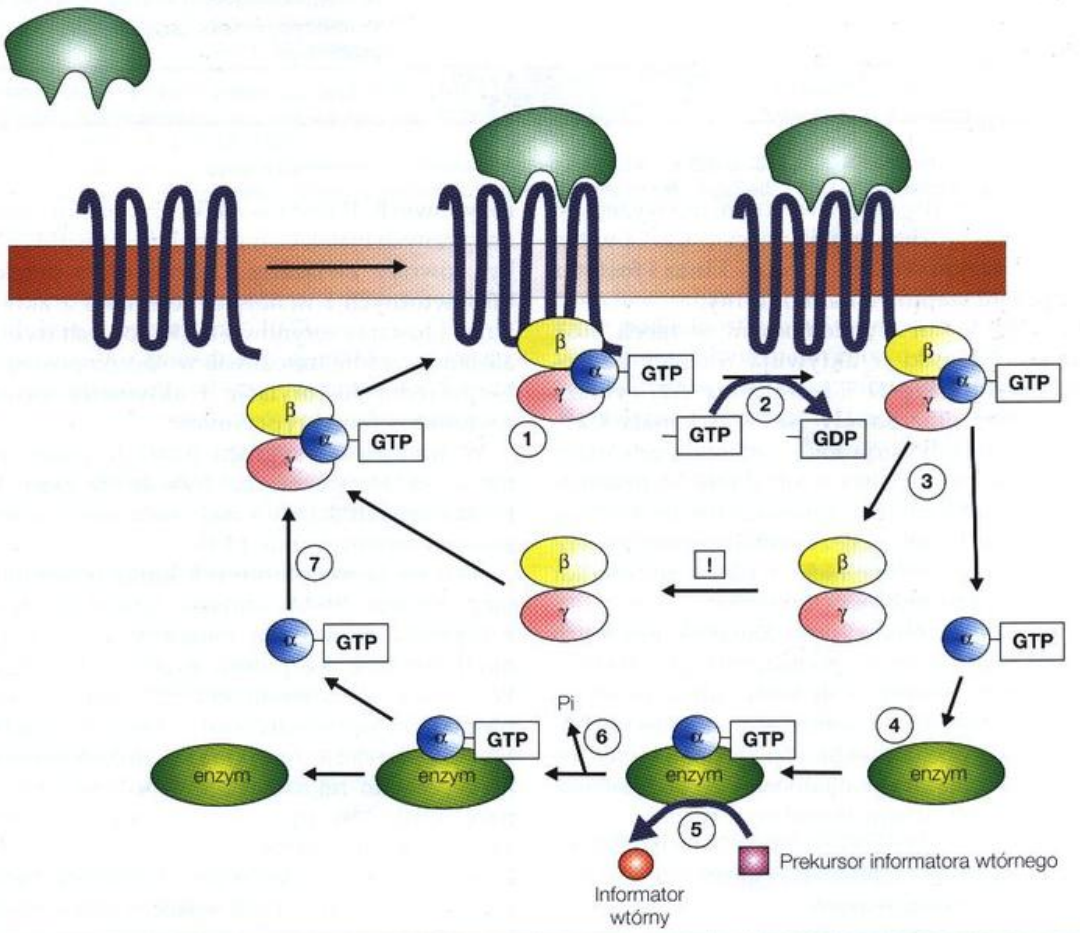
Kompleksy heterotrimerycznych białek G wiążą się do cytoplazmatycznych domen receptorów



Rycina 10.5 Porównanie mechanizmów przenoszenia sygnału z udziałem receptorów dla hormonów i neuropeptydów oraz receptorów dla cytokin. W przypadku receptorów dla hormonów i neuropeptydów przeniesienie sygnału zachodzi z udziałem heterotrimerycznych białek G. Receptory dla cytokin przenoszą sygnał za pomocą kinaz białkowych. W obu przypadkach są aktywowane enzymy syntetyzujące informator wtórny. Należy zaznaczyć, że kinazy związane z przeniesieniem sygnału przez receptory dla cytokin mogą również aktywować inne mechanizmy efektorowe z pominięciem informatorów wtórnych (patrz ryc. 10.7, 10.8 i 10.9).

po związaniu agonisty i aktywacji receptora. Po związaniu do receptora podjednostka α wiąże GTP i dysocjuje od podjednostek $\beta\gamma$. W tej postaci aktywuje swoisty enzym odpowiedzialny za syntezę informatora wtórnego. Niektóre podjednostki α mogą również bezpośrednio aktywować niektóre kanały i wymienniki jonowe. Po aktywacji enzymu GTP jest hydrolizowany do GDP, podjednostka α reasocjuje z podjednostkami $\beta\gamma$ i cały układ wraca do stanu wyjściowego. Działanie heterotrimerycznych białek G przedstawiono na rycinie 10.6.

Istnieją co najmniej cztery podrodziny podjednostek α, każda reprezentowana przez przynajmniej kilku przedstawicieli związanych i aktywowanych przez swoiste receptory. Przykłady podjednostek α, ich funkcje jako czynników transdukujących sygnał oraz związane z nimi receptory przedstawiono w tabeli 10.3. Jak widać, podjednostki α_s są aktywatorami **cyklazy adenylanowej i pobudzają produkcję cAMP**, a za jego pośrednictwem aktywują kinazy A. Podjednostki α_i są inhibitorami **cyklazy adenylanowej, hamują wytwarzanie cAMP** i w ten sposób hamują aktywność kinaz A. Podjednostki z podrodziny α_q są natomiast aktywatorami enzymów syntetyzujących informatory wtórne z fosfolipidów błonowych. Enzym aktywowany przez te podjednostki, **fosfolipaza Cβ** (PLCβ) rozkłada difosforan fosfatydyloinozytolu do **diacyloglicerolu** (DG) i **trifosforanu inozytolu** (IP_3). DG (tab. 10.2) z udziałem jonów wapnia aktywuje



Rycina 10.6 Aktywacja i funkcja heterotrimerycznych białek G. Związanie ligandu przez receptor powoduje jego interakcję z białkiem G (1) oraz wiązanie GTP przez podjednostkę α(2). Związana z GTP podjednostka α oddysocjowuje następnie od podjednostek $\beta\gamma$ (3) i wiąże się i aktywuje enzym odpowiedzialny za syntezę informatora wtórnego (4) lub bezpośrednio aktywuje kanał jonowy. Synteza informatora wtórnego (5) lub otwarcie kanału zachodzi do czasu uczynnienia aktywności GTP-azowej podjednostki α i hydrolizy GTP do GDP (6). Związana z GDP podjednostka α oddysocjowuje od enzymu lub kanału i powtórnie wiąże się z podjednostkami $\beta\gamma$ (7). Wolne podjednostki $\beta\gamma$ powstałe po dysocjacji α-GTP również mogą aktywować enzymy syntetyzujące informatory wtórne i kanały jonowe.

Tabela 10.3 Przykłady jednostek α heterotrimerycznych G, ich funkcje oraz związane z nimi receptory hormonów, neurohormonów i neurotransmiterów.

Podrodzina podjednostek α	Podjednostka α	Funkcja	Przykłady receptorów
α_s	α_s	stymulacja cyklazy adenylanowej	β-adrenergiczne; dopaminowe D1 i D5; serotoninowe 5-HT1 i 5-HT4; histaminowe H2; glutaminergiczne mGlu1; melatoninowe; purynergiczne P1A1 i P1A3; wazopresynowe V2; dla glukagonu; dla luteotropiny; dla folikulostymuliny; dla gonadotropiny kosmówkowej; receptory zapachowe
α_i/α_o	$\alpha_i;\alpha_o$	hamowanie cyklazy adenylanowej	α_2-adrenergiczne; dopaminowe D2; cholinergiczne M2 i M4; B GABA-ergiczne; glutaminergiczne mGlu2; purynergiczne P1A2A i P1A2B; opiatowe μ i δ; Y1 i Y2 neuropeptydu Y
	α_t	aktywacja fosfodiesterazy cGMP	rodopsyna
α_q	α_q	stymulacja fosfolipazy Cβ	α_1-adrenergiczne; dopaminowe D1; serotoninowe 5-Ht2; histaminowe H1; cholinergiczne M1, M3 i M5; glutaminergiczne mGlu1α; purynergiczne P2y; κ opiatowe; Y1 i Y2 neuropeptydu Y; wazopresynowe V1; dla trombiny; dla bradykininy; dla cholecystokininy; dla endoteliny, dla niektórych hormonów przysadki (ACTH, TSH); dla parathormonu
α_{12}	α_{12}	regulacja niektórych kanałów jonowych i wymienników Na^+/K^+	–

kinazy Cα, β i γ. IP_3, jak już wspomniano wyżej, jest natomiast czynnikiem mobilizującym Ca^{2+} i w ten sposób przyczynia się do aktywacji **kinaz i fosfataz zależnych od wapnia i kalmoduliny**.

Poza enzymami wymienionymi w tabeli 10.3, różne podjednostki α **aktywują** również bezpośrednio **fosfolipazę D i fosfolipazę A2, cyklazę guanylanową** oraz **kanały Na^+/K^+** i **kanały Ca^{2+}**. Bezpośrednia aktywacja kanałów jonowych przez podjednostki α odgrywa istotną rolę w przekaźnictwie synaptycznym, doprowadzając do szybkiej depolaryzacji błony. Należy jednak zaznaczyć, że mechanizm ten jest wolniejszy niż w przypadku aktywacji receptorów jonotropowych.

Aktywacja enzymów oraz kanałów jonowych zachodzi również przez podjednostki βγ. Podjednostkom tym przypisuje się także udział w rekrutacji substratów dla enzymów syntetyzujących informatory wtórne. Podjednostki βγ pełnią więc nie tylko rolę regulatora podjednostek α, ale również aktywnie uczestniczą w transdukcji sygnału.

Receptory związane z transdukcją sygnału z udziałem kinaz tyrozynowych

Receptory te są typowymi receptorami dla cytokin z grupy czynników wzrostu, neurotrofin, interleukin, niektórych czynników z rodziny TNF oraz czynników hemopoetycznych. W przeciwieństwie do receptorów metabotropowych przeniesienie sygnału przez błonę zachodzi z udziałem **kinaz tyrozynowych**. Podobnie jak w przypadku heterotrimerycznych białek G, mechanizm transdukcji może być również **związany z tworzeniem przekaźników wtórnych** i w dalszej kolejności z aktywacją kinaz i fosfataz serynowo-treoninowych (ryc. 10.5), ale jednocześnie umożliwia w sposób pośredni lub bezpośredni **fosforylację i aktywację swoistych czynników transkrypcyjnych**.

W transdukcję sygnału przez tę grupę receptorów są zaangażowane **trzy różne typy kinaz tyrozynowych**, każdy z nich związany z określoną grupą receptorów (tab. 10.4).

Aktywacja **receptorowych kinaz tyrozynowych** (ang. *receptor protein tyrosine kinase*) związanych z czynnikami wzrostu następuje w wyniku homodimeryzacji receptorów przez swoiste ligandy. W wyniku tej homodimeryzacji dochodzi do aktywacji cytoplazmatycznej domeny kinazowej i autofosforylacji receptora. Autofosforylacja jest konieczna do rekrutacji aktywowanych przez kinazę substratów, np. enzymów odpowiedzialnych za syntezę informatorów wtórnych (PLCγ, PI-3K, PLA_2), kinaz tyrozynowych z rodziny Src oraz niewykazujących właściwości enzymatycznych tak zwanych **białek adaptorowych** (ang. *adaptor proteins*). Te ostatnie pełnią rolę w aktywacji innych szlaków przekazywania sygnałów, np. szlaków związanych z białkami RAS (przedstawiciele innej rodziny białek G) i aktywacją kaskad kinaz MAP (ang. MAPK – *mitogen-activated protein kinase*), które

Tabela 10.4 Trzy typy kinaz tyrozynowych, aktywowane przez nie enzymy, informatory wtórne i czynniki transkrypcyjna oraz związane z nimi rodzaje receptorów

Rodzaje kinezy tyrozynowej	Receptory	Aktywny enzym	Informator wtórny i związana z nim kineza serynowo-treoninowa	Inne bezpośrednio aktywowane czynniki
Receptorowe kinazy tyrozynowe (kinazy będące cytoplazmatycznymi domenami receptorów)	rodziny receptorów dla czynników wzrostu z rodziny EGF, FGF, PDGF i czynników insulinopodobnych; rodzina receptorów dla neurotrofin	PLCγ	DG → PKCα, β i γ	–
			$IP_3 \rightarrow Ca^{2+}$ → CaMK	–
		PI-3K	PIP_3 → PKCζ	–
		PLA_2	kwas arachidonowy → PKCα, β i γ	–
		–	–	białko Ras
				czynniki transkrypcyjne Stat
Kinazy z rodziny Src	jak wyżej oraz receptory dla antygenu limfocytów T, receptory immunoglobulinowe limfocytów B, receptory dla fragmentów Fc immunoglobulin	PLCγ	DG → PKCα, β i γ	
		PI-3K	$IP_3 \rightarrow Ca^{2+}$ → CaMK	
		PLA_2	PIP3 → PKCζ	
			kwas arachidonowy → PKCα, β i γ	
Kinazy Jak/Tyk	rodziny receptorów dla hematopoetyn*, interferonów, czynników z rodziny TNF i interleukiny 1 (IL-1)	–	–	czynniki transkrypcyjne Stat**

* Rodzina ta składa się z dwóch podklas: podklasy A, do której należą receptory rodziny receptorów dla hormonu wzrostu, PRL, EPO, G-CSF itp., receptory rodziny receptorów dla IL-3, IL-5, i GM-CSF, receptory rodziny receptorów dla IL-2, IL-4, IL-13 i IL-15 oraz podklasy B, do której należą receptory rodziny receptorów IL-6, IL-12, LIF i CNTF.

** Różne typy receptorów aktywują różne czynniki Stat, np. interferony aktywują białka Stat1 i 2; EGF, G-CSF, IL-2, IL-10 i czynniki z rodziny IL-6 aktywują białka Stat3; IL-2, IL-7, IL-15, czynniki z rodziny czynnika wzrostu i czynniki z rodziny IL-3 aktywują Stat5, a IL-4 i IL13 aktywują Stat6.

są ściśle związane z aktywacją proliferacji komórek lub indukcją apoptozy (ryc. 10.7).

W przypadku transdukcji sygnałów od receptorów niemających własnej aktywności kinazy tyrozynowej, takich jak receptory dla antygenu limfocytów T i B lub receptory dla fragmentów Fc przeciwciał, biorą udział również związane z błoną komórkową tak zwane **niereceptorowe kinazy z rodziny Src** (ryc. 10.8). Z kolei, nieposiadające aktywności kinazy tyrozynowej receptory dla cytokin po związaniu ligandu rekrutują i aktywują cytoplazmatyczne kinazy tyrozynowe z rodziny Jak/Tyk (ryc. 10.9). W tym typie przekaźnictwa nie uczestniczą informatory wtórne. Kinazy Jak/Tyk bezpośrednio fosforyzują i aktywują **czynniki transkrypcyjne STAT** i w ten sposób nieomal bezpośrednio wpływają na ekspresję swoistych genów.

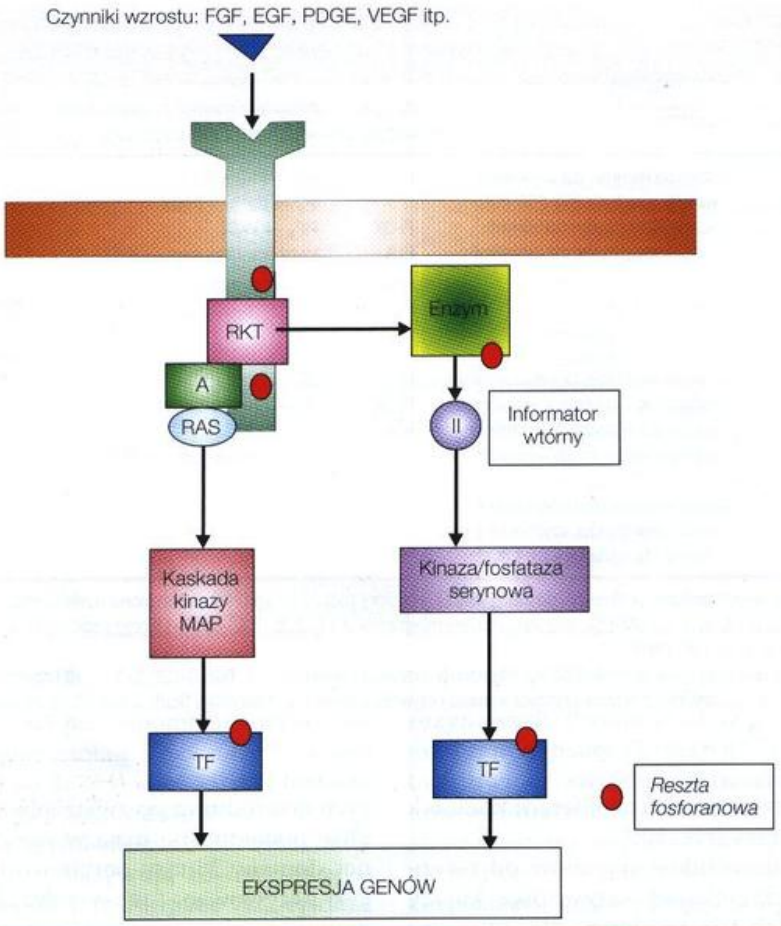
Receptory związane z transdukcją sygnału z udziałem kinaz serynowo-treoninowych

Receptory te są typowymi receptorami dla cytokin z nadrodziny transformującego czynnika wzrostu β (TGF-β). Do nadrodziny tej należą TGF-β, białka morfogenetyczne kości (BMP), inhibina, aktywina itp. Ich receptory tworzą zupełnie odrębną rodzinę. Są one zbudowane z dwóch podjednostek tworzących heterodimer po związaniu swoistego ligandu. Obie podjednostki mają w części cytoplazmatycznej domeny kinazy serynowo-treoninowej, która jest aktywowana w wyniku heterodimeryzacji. Swoistymi substratami tej receptorowej kinazy serynowo-treoninowej są czynniki transkrypcyjne z rodziny Smad, które po ufosforylowaniu są translokowane do jądra komórkowego i inicjują ekspresję swoistych genów (ryc. 10.10). Pod tym względem mechanizm działania tych receptorów jest trochę podobny do działania receptorów aktywujących kinazy tyrozynowe Jak/Tyk.

Aktywacja czynników Smad nie jest jedynym mechanizmem transdukcji sygnału przez tę klasę receptorów. Istnieją dowody, że receptory te mogą również aktywować inne szlaki przekazywania sygnałów.

Inne szlaki receptorowe niezwiązane z heterotrimerycznymi białkami G i kinazami

Poza klasycznymi szlakami przekazywania sygnału z udziałem białek G lub kinazami związanymi z receptorami oraz informatorami wtórnymi istnieje szereg innych szlaków opartych na innych, niekiedy nie do końca poznanych mechanizmach. Kilka z nich omówiono poniżej.



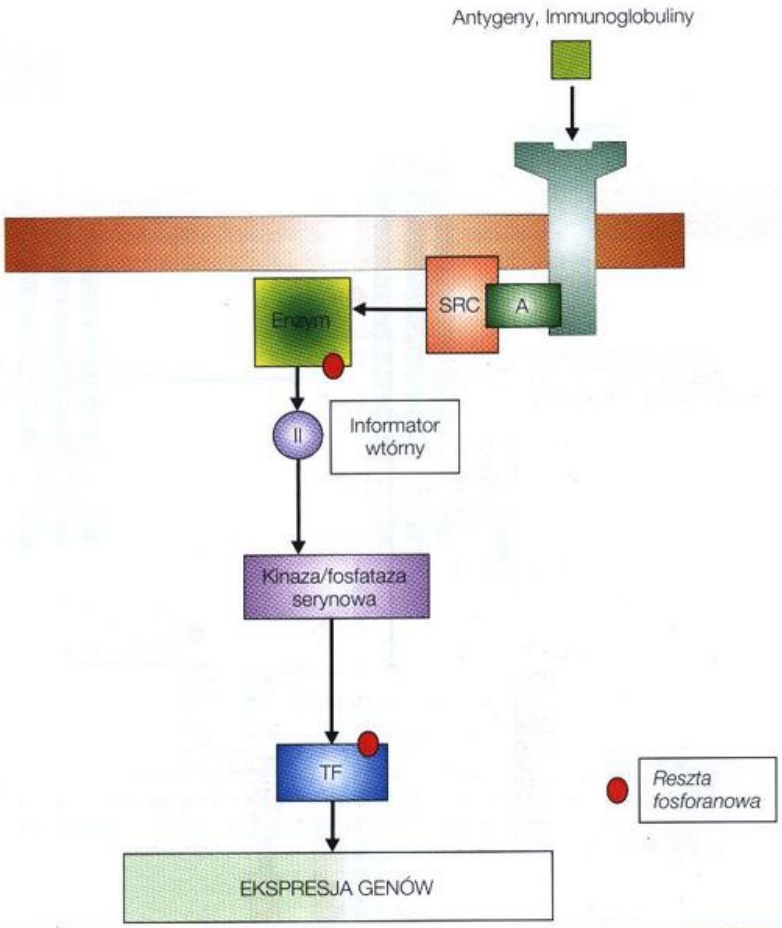
Rycina 10.7 Mechanizm przekazywania sygnałów przez receptory cytokin – czynników wzrostu. Receptory dla czynników wzrostu działają przez receptorową kinazę tyrozynową (RKT), którą jest cytoplazmatyczna część receptora. RKT autofosforyluje receptor, co umożliwia interakcję z białkami adaptorowymi (A) związanymi aktywacją szlaku białka Ras i kaskady kinazy MAP, oraz aktywację enzymów (PLCγ, PI3K) produkujących informatory wtórne. Autofosforylacja receptorów dla czynników wzrostu jest wyznacznikiem ich aktywacji. Aktywacja kinaz MAP oraz klasycznych kinaz aktywowanych przez informatory wtówne prowadzi do fosforylacji i aktywacji (lub inaktywacji) specyficznych czynników transkrypcyjnych (TF) i regulacji ekspresji genów.

Receptory związane z aktywacją proteaz wewnątrzkomórkowych

Aktywacja niektórych szlaków metabolicznych wymaga udziału białek, których indukcja polega na ich **modyfikacji proteolitycznej**. Szczególnym przykładem jest aktywacja procesów prowadzących do apoptozy. Grupą receptorów, która najlepiej ilustruje to zjawisko, są indukujące apoptozę receptory z **rodziny receptorów dla TNF** (ryc. 4.2). Należą do nich receptor typu I dla TNF-α, receptor Fas/APO-1 (CD95), receptory DR4 i DR5 dla czynnika TRAIL oraz receptor DR3 dla czynnika TWEAK. Cechą charakterystyczną tych receptorów jest występowanie w części cytoplazmatycznej tak zwanej **domeny śmierci**. Po aktywacji receptorów, która jest uwarunkowana ich homotrimeryzacją przez związanie homotrimeru ligandu, domena śmierci rekrutuje swoiste białka adaptorowe (białko TRADD i FADD), tworzące kompleks aktywujący **kaskadę kaspaz**, proteaz cysteinowych będących efektorowymi enzymami indukującymi apoptozę (ryc. 10.11). Mechanizm ten nie wymaga udziału przekaźników wtórnych, kinaz lub fosfataz białkowych ani czynników transkrypcyjnych.

Szlaki związane z β-kateniną

B-katenina jest bardzo interesującym białkiem, które wiążąc się z wewnątrzcytoplazmatyczną domeną E-kadheryny, odgrywa rolę w regulacji połączeń międzykomórkowych. Jednocześnie β-katenina



Rycina 10.8 Mechanizm przekazywania sygnałów przez receptory komórek układu odpornościowego (receptor dla antygenu limfocytów T i B, receptor dla fragmentu Fc przeciwciał). Receptory te aktywują przy udziale białek adaptorowych (A) niereceptorową kinazę z rodziny Src oraz enzymy odpowiedzialne za syntezę informatorów wtórnych (PLCγ, PI3K). Kinazę Src mogą również aktywować receptory dla czynników wzrostu oraz receptory dla cytokin działające za pośrednictwem kinaz JAK (patrz ryc. 10.9). Efektem końcowym jest fosforylacja czynników transkrypcyjnych (TF) i regulacja ekspresji genów.

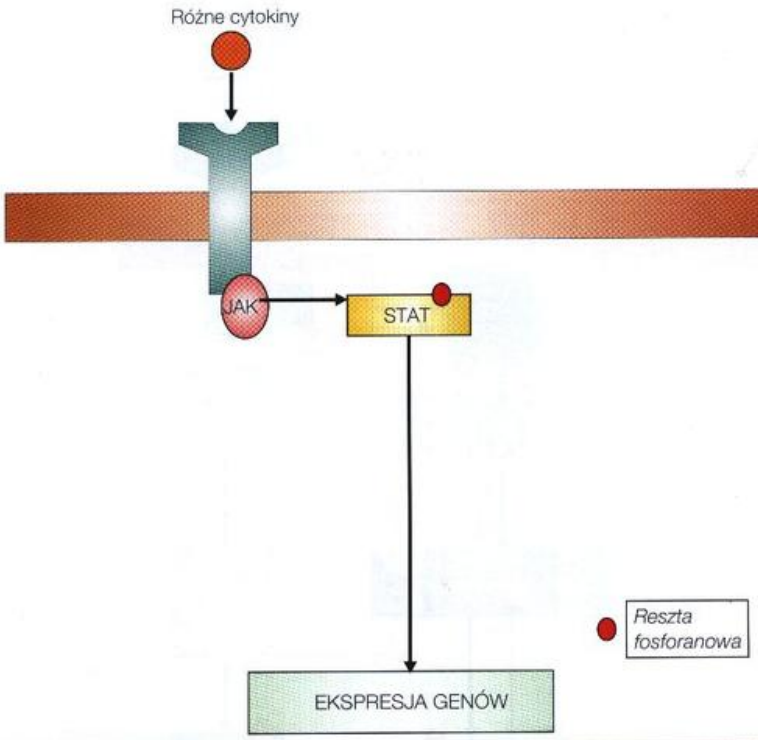
odgrywa rolę białka transdukującego i regulatora ekspresji genów w szlaku przekazywania sygnału przez białko WNT.

W przypadku braku WNT, które jest ligandem receptora FRIZZLED, występująca w cytoplazmie wolna β-katenina jest wychwytywana przez kompleks APC/Aksyna/kinaza GSK, dochodzi do jej ubikwitynacji i degradacji w proteasomach. Związanie WNT z FRIZZLED powoduje zablokowanie kompleksu APC/Aksyna/kinaza GSK, β-katenina gromadzi się w cytoplazmie, skąd przechodzi do jądra, gdzie wchodząc w interakcje z czynnikami transkrypcyjnymi TCF/LEF reguluje ekspresję genów. W tym kontekście bardzo interesujące wydaje się również białko APC (ang. *adenomatous polyposis coli*), które jako inhibitor β-kateniny pełni rolę antyonkogenu. Dziedziczne mutacje APC są przyczyną polipowatości jelita grubego, która nieleczona prowadzi do raka jelita grubego.

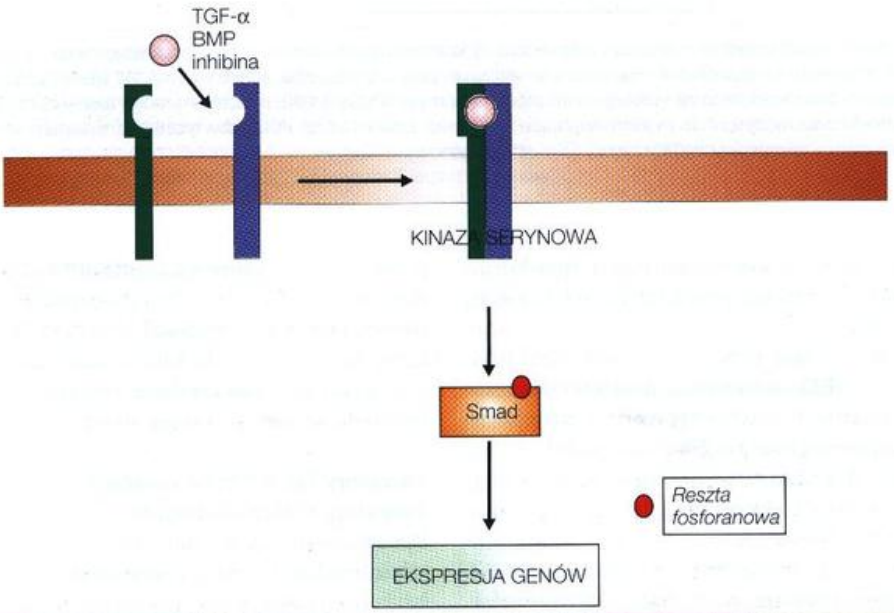
Podsumowanie szlaków związanych z β-kateniną przedstawiono na rycinie 10.12.

Receptory Toll-podobne związane z indukcją reakcji zapalnych

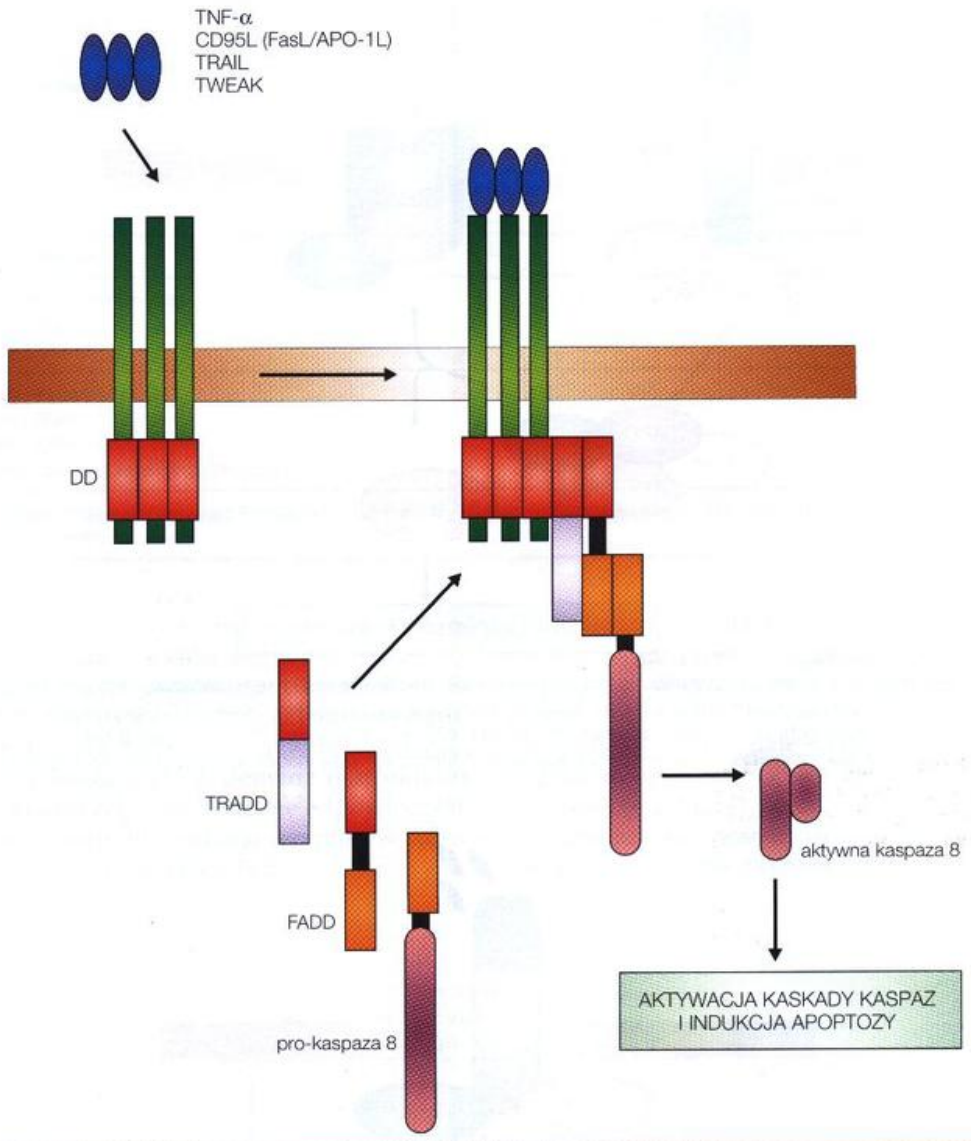
Receptory Toll-podobne (ang. *toll-like receptors*, TLR) stanowią bardzo istotny element odporności nieswoistej. Rozpoznają one rozmaite, kluczowe składniki budowy większości wirusów i bakterii, a ich aktywacja prowadzi do indukcji reakcji zapalnych, a także ułatwia indukcję swoistej odpowiedzi odpornościo-



Rycina 10.9 Mechanizm przekazywania sygnałów przez receptory dla czynników wzrostu. Receptory te po związaniu ligandu wiążą się i aktywują cytoplazmatyczne kinazy z rodziny JAK/TYK. Kinazy JAK bezpośrednio fosforylują i aktywują czynniki transkrypcyjne STAT. Fosforylacja STAT zachodzi również z udziałem receptorów dla czynników wzrostu. Inne czynniki transkrypcyjne (TF) są aktywowane pośrednio przez kinazę MAP lub inne kinazy/fosfatazy białkowe uczynniane przez informatory wtórne.



Rycina 10.10 Przekazywanie sygnałów przez receptory dla czynników z rodziny TGF-β. Receptory te zbudowane są z dwóch różnych podjednostek, które heterodimeryzują po związaniu ligandu. Cytoplazmatyczna domena heterodimeru ma aktywność kinazy serynowo-treoninowej, która bezpośrednio fosforyluje i aktywuje czynniki transkrypcyjne Smad.



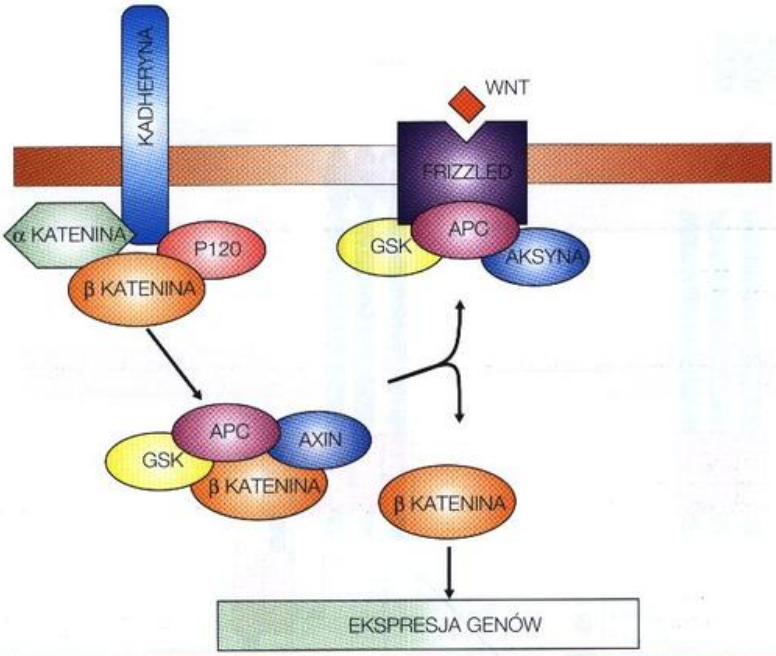
Rycina 10.11 Przekazywanie sygnału przez proapoptotyczne receptory dla czynników z rodziny TNF-α. Przekazanie sygnału następuje po trymeryzacji receptorów. Występujące w cytoplazmatycznej części receptorów tzw. domeny śmierci inicjują wiązanie białek adaptorowych TRADD i FADD. Ostatnie z nich wiąże prokaspazę, która w tych okolicznościach ulega autoproteolitycznej aktywacji i indukuje proces apoptozy.

wej. Związanie ligandu przez TLR prowadzi do rekrutacji i aktywacji białek adaptorowych, takich jak MyD88, TIRAP lub TRAM, które następnie aktywują fosforylację i degradację inhibitora czynnika transkrypcyjnego NK-κB. Uwolniony czynnik NF-κB jest translokowany do jądra, gdzie aktywuje ekspresję genów związanych z reakcją zapalną. Równolegle może być aktywowana fosforylacja czynnika transkrypcyjnego IRF, który indukuje ekspresję interferonu typu I oraz szlak kinaz MAP.

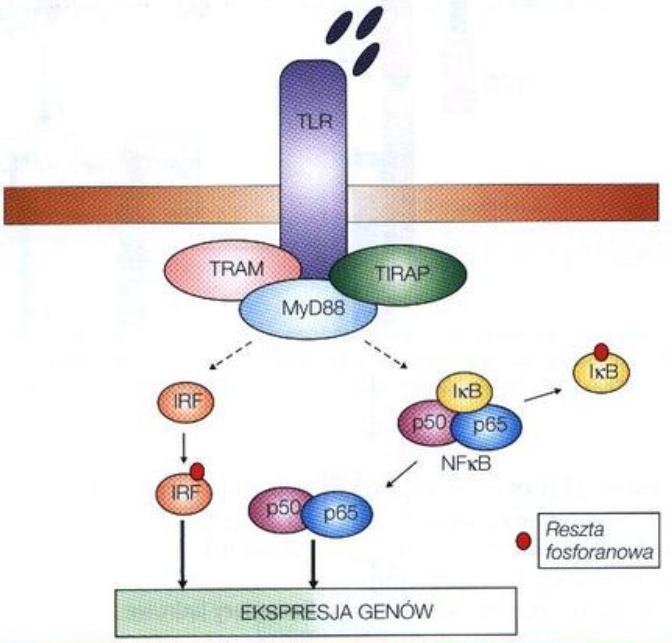
Uproszczony schemat przekazywania sygnałów od receptorów Toll-podobnych przedstawiono na rycinie 10.13.

Receptory jądrowe

Receptory jądrowe są zupełnie odrębną klasą receptorów występujących w cytoplazmie i jądrze komórkowym, których ligandami są łatwo przenikające przez błonę **czynniki o charakterze hydrofobowym**, takie jak: hormony steroidowe, witamina



Rycina 10.12 Mechanizm przekazywania sygnałów z udziałem β-kateniny. B-katenina pełni rolę w stabilizacji połączeń międzykomórkowych z udziałem kadheryn. W cytoplazmie wolna β-katenina jest kompleksowana przez układ białek APC/GSK/Aksyna, ulega ubikwitynacji i degradacji w proteasomach. W przypadku aktywacji receptora FRIZZLED przez ligand WNT kompleks β-kateniny z białkami APC/GSK/Aksyna ulega dysocjacji, cząsteczki β-kateniny akumulują się w cytoplazmie i przechodzą do jądra, gdzie działają jako regulatory transkrypcji.



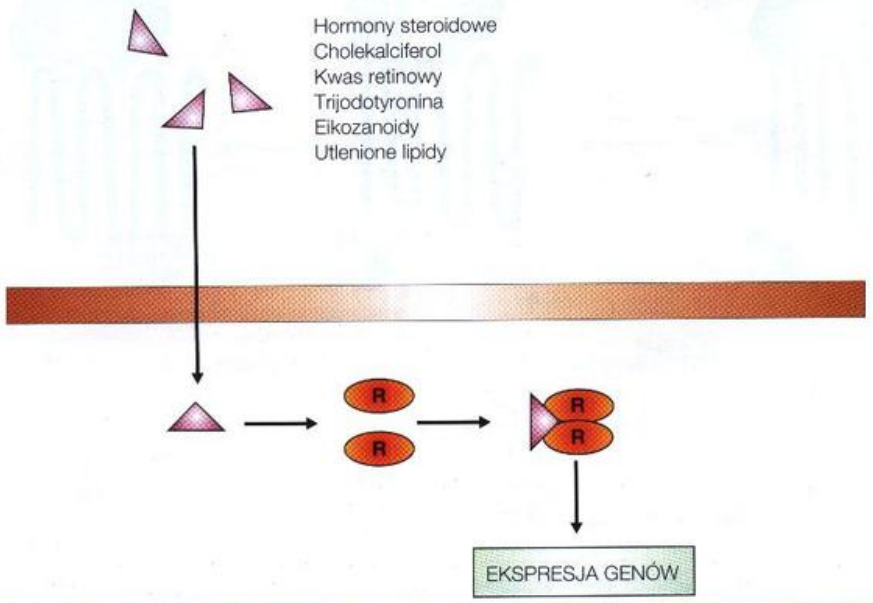
Rycina 10.13 Mechanizm przekazywania sygnałów przez receptory Toll-podobne (TLR). Po związaniu ligandów, którymi mogą być produkty bakterii, wirusów oraz wolne kwasy nukleinowe, receptory te za pośrednictwem białek adaptorowych MyD88, TRAM lub TIRAP aktywują szlaki prowadzące do fosforylacji i uczynnienia czynników transkrypcyjnych, takich jak NF-κB, IRF oraz AP1 (niepokazanych na schemacie), i indukcji ekspresji genów związanych z reakcjami zapalnymi. W przypadku czynnika NF-κB jest on aktywowany po fosforylacji i degradacji jego inhibitora białka IκB.

Tabela 10.5 Rodzina receptorów jądrowych.

Receptory dla steroidów
estrogenów
testosteronu
progesteronu
glukokorytykoidowe
mineralokortykoidowe
Receptory kalcyferolowe
Receptory dla hormonów tarczycy
α-trójjodotyroninowe
β-trójjodotyroninowe
Receptory dla retinoidów
RARα, RARβ, RARγ
RXRα, RXRβ, RXRγ
RZR (receptor „sierocy", receptor dla melatoniny?)
PPAR (Peroxisome Proliferator Activated Receptors) – receptory dla eikosanoidów oraz nienasyconych i utlenionych kwasów tłuszczowych
PPARα, PPARβ i PPARγ

D3, kwas retinowy (pochodna witaminy A), hormony tarczycy oraz niektóre pochodne nienasyconych kwasów tłuszczowych (np. eikozanoidy). Są peptydami o budowie typowych **czynników transkrypcyjnych**: poza hydrofobową domeną wiążącą ligand **mają wiążącą DNA domenę o strukturze „palców cynkowych"** oraz **domenę odpowiedzialną za dimeryzację**. Klasyfikację receptorów jądrowych przedstawiono w tabeli 10.5.

Mechanizm działania tych receptorów wydaje się niezwykle prosty. Po związaniu ligandu występującego w cytoplazmie są one dimeryzowane (homo- lub heterodimeryzacja) i następnie translokowane do jądra, gdzie wiążą się z sekwencjami regulatorowymi swoistych genów, inicjując ich ekspresję (ryc. 10.14). Jest to więc najprostszy mechanizm przekazywania sygnału, w którym **receptor** jest jednocześnie **czynnikiem transkrypcyjnym**



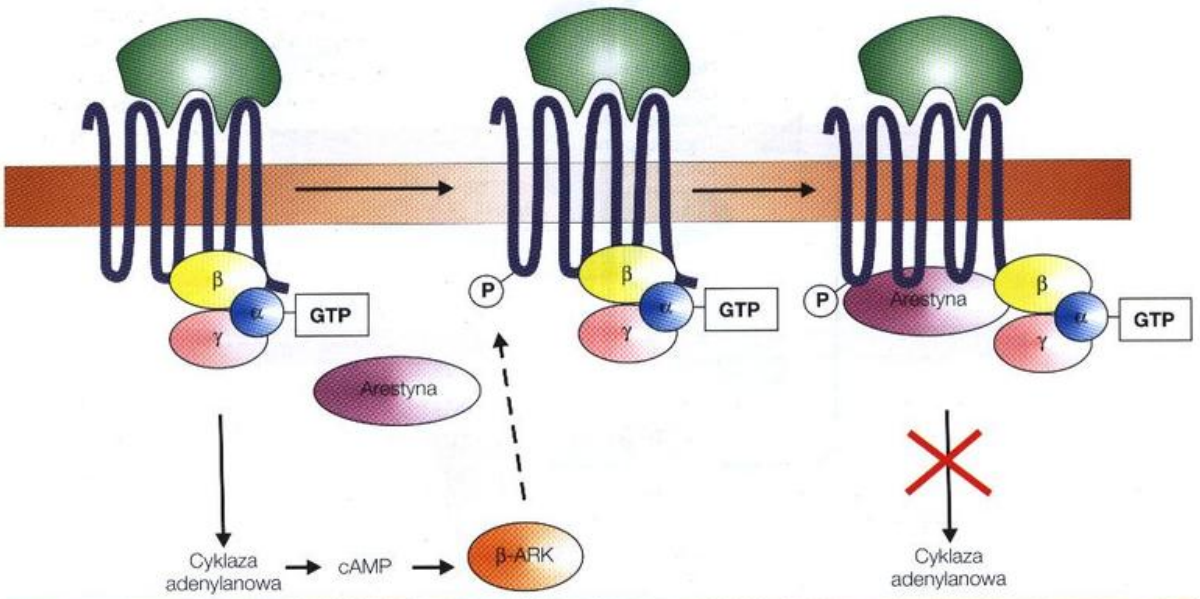
Rycina 10.14 Przekazywanie sygnału przez receptory jądrowe. Ligand, który przedostał się do cytoplazmy, wiąże dwie podjednostki receptora, który ulega następnie translokacji do jądra, gdzie pełni funkcje czynnika transkrypcyjnego.

i nie występują czynniki warunkujące transdukcję sygnału przez: błonę (białka G, kinazy tyrozynowe), informatory wtórne i układ kinaz/fosfataz serynowo-treoninowych. Warto jeszcze zaznaczyć, że receptory jądrowe mogą dimeryzować nie tylko między sobą, ale również z innymi czynnikami transkrypcyjnymi, np. Jun i Fos (typowe składniki czynnika transkrypcyjnego AP-1), co wielokrotnie zwiększa ich zakres aktywności biologicznej.

Regulacja funkcji receptorów

Prawidłowa reakcja komórki na informację z zewnątrz zależy nie tylko od wystąpienia transdukcji sygnału i indukcji swoistych przemian metabolicznych i czynnościowych w komórce, ale również od czasu trwania sygnału. W większości przypadków sygnał trwa bardzo krótko (milisekundy, sekundy), a jego wydłużenie może doprowadzić do poważnych zaburzeń funkcji komórki. Nie jest zatem zaskakujące, że zostały wykształcone mechanizmy ściśle kontrolujące funkcje receptorów. Należą do nich: **zjawisko fosforylacji** lub **defosforylacji receptorów**, **blokowanie funkcji receptorów przez swoiste białka regulatorowe**, ich **internalizacja i degradacja** oraz **„złuszczanie" z powierzchni komórek**. Unieczynnienie funkcji receptorów lub ich utrata w wyniku degradacji lub złuszczenia, prowadząca do czasowej niezdolności komórki do odpowiedzi na określoną informację, określa się jako **desensytyzację receptorów** lub **desensytyzację komórki**.

W przypadku aktywowanych receptorów najszybszym i najefektywniejszym mechanizmem desensytyzacji jest ich fosforylacja lub defosforylacja przez aktywowane w procesie przekazywania sygnału swoiste kinazy i fosfatazy białkowe. Fosforylacja niektórych receptorów powoduje utratę powinowactwa do swoistych ligandów i dysocjację kompleksu receptor-ligand lub związanie białka hamującego dalsze przekazywanie sygnału. Przykładem jest fosforylacja receptorów związanych z białkami G_s i aktywacją cyklazy adenylanowej (np. receptorów β-adrenergicznych). Są one fosforylowane przez równolegle aktywowane, swoiste, zależne od cAMP kinazy serynowo-treoninowe (kinazy A), zwane kinazami β-ARK. Ufosforylowane receptory są następnie wiązane przez hamujące białko arestynę (ang. *arrestin*) i przekazywanie sygnału zostaje zablokowane. W przypadku receptorów aktywowanych przez fosforylację (autofosforylację), np. receptorów dla czynników wzrostu, mogą one być defosforylowane przez swoiste, jednocześnie aktywowane fosfatazy tyrozynowe, co hamuje transdukcję sygnału. Desensytyzację receptora z udziałem kinazy β-ARK i białka arestyny przedstawiono na rycinie 10.15.



Rycina 10.15 Mechanizm negatywnej regulacji funkcji receptorów związanych z białkami G. Aktywowane przez kompleks receptor–ligand białko G pobudza cyklazę adenylanową i wytwarzanie cAMP, które aktywuje będącą kinazą A kinazę receptora β-adrenergicznego (β-ARK). β-ARK fosforyluje cytoplazmatyczną część receptora, co następnie umożliwia wiązanie białka arestyny, zablokowanie receptora i zahamowanie dalszego przekazywania sygnału.

Wolniejszym mechanizmem hamowania przekazywania sygnału jest internalizacja receptorów w wyniku endocytozy. Związanie ligandu jest jednocześnie sygnałem do ich endocytozy w obrębie wgłębień okrytych. W utworzonych endosomach, zwanych w tym przypadku **receptorosomami**, jest aktywowana pompa protonowa, co prowadzi do obniżenia pH w obrębie pęcherzyka i dysocjację kompleksu receptor-ligand. W dalszej kolejności receptorosomy mogą łączyć się z lizosomami i wtedy zarówno receptory, jak i ligandy mogą zostać proteolitycznie zdegradowane. Tworzenie się receptorosomów ma dodatkowo inny istotny aspekt. W niektórych przypadkach mogą bowiem **transportować kompleksy receptor-ligand do organelli komórkowych lub na drugą stronę komórki** bądź **przenosić informację do ściśle określonych obszarów cytoplazmy**.

Ważnym mechanizmem regulacji funkcji receptorów jest również ich „złuszczanie" z powierzchni błony do środowiska. Złuszczanie to zachodzi pod wpływem proteaz powierzchniowych związanych z zewnętrzną częścią błony komórkowej. Zjawisko to nie tylko prowadzi do terminacji przekazywania sygnału, ale również powoduje powstanie **receptorów rozpuszczalnych**, które zachowując zdolność do wiązania ligandów, mogą w kompetycyjny sposób ograniczać ich dostęp do receptorów związanych z błoną komórkową, regulując w ten sposób reakcje fizjologiczne.

Należy również zaznaczyć, że przekazywanie sygnałów może być kontrolowane przez **naturalne ligandy o właściwościach antagonistycznych**, które kompetycyjnie, blokując receptor, zapobiegają jego aktywacji przez ligandy–agonistów. Przykładem takiego naturalnego antagonisty jest antagonista receptora interleukiny 1 (IL-1Ra), cytokina z rodziny IL-1 regulująca wpływ pozostałych cytokin z tej rodziny (IL-1α i IL-1β), zwłaszcza w kontekście ich działania prozapalnego.

KLINIKA

Komunikacja międzykomórkowa, a przede wszystkim odbiór i przekazywanie sygnału przez receptory są głównymi regulatorami rozwoju i homeostazy organizmu. Nietrudno zatem wyobrazić sobie, że jakiekolwiek zakłócenie tej homeostazy może prowadzić do zaburzeń rozwojowych i choroby. Rzeczywiście, istnieje coraz więcej dowodów, że zakłócenia funkcji receptorów lub związanych z nimi szlaków przekazywania sygnału są głównymi czynnikami etiopatogenetycznymi wielu różnych chorób i wad rozwojowych.

Choroby związane z nieprawidłowym funkcjonowaniem układu odbioru i przetwarzania informacji można podzielić na takie, które są związane z niedostatecznym przekazywaniem sygnałów, oraz takie, których podłożem jest nadmierna aktywacja mechanizmów przekazywania sygnałów.

Główną przyczyną niedostatecznego przekazywania sygnałów jest najczęściej brak funkcjonalnego receptora lub innych czynników odpowiedzialnych za przeniesienie sygnału przez błonę, np. białek G lub kinaz/fosfataz białkowych. Podobny efekt może również wywołać nadmierna aktywność czynników hamujących funkcje receptorów lub czynników przenoszących sygnał. Przyczyną nadmiernego przekazywania sygnału może być natomiast nadekspresja receptorów lub czynników odpowiedzialnych za przeniesienie sygnału przez błonę, ich niewłaściwa aktywacja lub nieprawidłowa desensytyzacja receptorów i układu przenoszenia sygnału.

Powodem wymienionych wyżej zaburzeń są najczęściej mutacje (nabyte lub dziedziczone), działanie czynników infekcyjnych (toksyny interferujące z różnymi czynnikami na szlaku przekazywania sygnału), egzogennych czynników chemicznych lub zaburzenia syntezy receptorów i związanych z nimi czynników przenoszących sygnał z powodu zaburzonej regulacji zwrotnej zależnej od poziomu ligandu. Przytaczanie zbyt wielu konkretnych przykładów przekracza ramy niniejszego opracowania. Należy jednak wspomnieć, że takie zakłócenia związane z mutacjami genów kodujących różne elementy kaskady przekazywania sygnałów, związanych na przykład z regulacją proliferacji komórek, są przyczyną chorób nowotworowych. Do najczęstszych mutacji tego typu należą mutacje receptorów dla czynników wzrostu, powodujące konstytutywną aktywację receptorowych kinaz tyrozynowych lub mutacje białka Ras prowadzące do utraty jego aktywności GTP-azowej i jego ciągłej aktywności po związaniu GTP.

Innym przykładem są liczne choroby o podłożu endokrynologicznym (niedoczynność lub nadczynność gruczołu, brak reaktywności lub nadreaktywność na hormony), w których często, poza przypadkami utraty funkcjonalnych receptorów, obserwuje się mutacje genów kodujących podjednostki α białek G (zarówno $G\alpha_s$, $G\alpha_{i/o}$, jak i $G\alpha_q$). Mutacje w obrębie białek G mogą dotyczyć zarówno regionu odpowiedzialnego za wiązanie GTP, jak i regionu odpowiedzialnego za aktywność GTP-azy. W pierwszym przypadku brak wiązania GTP wywołuje niezdolność do przekazania sygnału, w drugim niezdolność do

hydrolizy GTP powoduje konstytutywną aktywację białka, brak desensytyzacji układu przekazywania sygnału i nadmierne jego przenoszenie. W układzie, w którym są stymulowane białka $G\alpha_{i/o}$, hamujące aktywność cyklazy adenylanowej, porównywalne mutacje wywierają akurat odwrotny efekt. Wykrywanie mutacji odpowiedzialnych za zaburzenia szlaków przekazywania sygnałów ma coraz większe znaczenie kliniczne. Analiza mutacji w sposób istotny wspomaga klasyczne metody diagnostyki oraz jest podstawą nowoczesnej klasyfikacji różnych odmian rodzajów chorób, które dotychczas były trudne do rozpoznania.

Omawiając potencjalne zaburzenia funkcji białek G, należy też wspomnieć o ich wrażliwości na niektóre toksyny bakteryjne. Białka $G\alpha_s$ są wrażliwe na **toksynę cholery**, która je rybozyluje, stabilizując wiązanie GTP. Białka $G\alpha_{i/o}$ są natomiast rybozylowane przez **toksynę krztuśca**, co powoduje stabilizację wiązania GDP. W obu przypadkach dochodzi do podwyższenia stężenia cAMP w komórce. Warto też nadmienić, że wrażliwość na określoną toksynę stała się podstawą klasyfikacji białek Gα.

Z punktu widzenia konsumenta podstawowych używek, jakimi są kawa i herbata, należy też pamiętać, że zawarte w nich alkaloidy są inhibitorami fosfodiesterazy cAMP. Enzym ten jest odpowiedzialny za hydrolizę cAMP, od jego aktywności zależy więc pośrednio aktywacja kinaz A. Ponieważ kinazy A są między innymi związane z metabolizmem glikogenu, nadużywanie wspomnianych napojów może mieć istotny wpływ na gospodarkę cukrowcową organizmu.

Wystąpienie określonego zaburzenia w mechanizmie odbioru i przekazywania sygnału spowodowanego mutacją zależy od roli, jaką pełni zmutowany czynnik. W przypadku czynników stymulujących, mutacje prowadzące do ich aktywacji mają charakter dominujący i mutacja jednego allelu wystarczy do patologicznego pobudzenia przekazywania sygnału. Mutacje inaktywujące czynniki hamujące są natomiast mutacjami recesywnymi. Mutacja jednego allelu jest na ogół niewystarczająca do eliminacji czynnika hamującego i wystąpienie choroby zależy od mutacji obu alleli. Pod tym względem geny kontrolujące przekazywanie sygnałów zachowują się tak samo jak onkogeny i antyonkogeny w procesie rozwoju choroby nowotworowej.

Dotychczasowe odkrycia wskazują, że poznanie funkcji receptorów oraz dokładne zbadanie swoistych szlaków przekazywania sygnału mają fundamentalne znaczenie kliniczne. Wiedza ta pozwala wyjaśnić etiologię wielu różnych, niekiedy często występujących chorób oraz pozwala lepiej zrozumieć mechanizmy leżące u podłoża wielu procesów patologicznych. Nie ulega również wątpliwości, że wiedza ta umożliwi stworzenie nowych, skuteczniejszych metod terapii opartych na farmakologicznej lub genetycznej modyfikacji szlaków przekazywania sygnałów.

Podsumowanie

W podsumowaniu należy stwierdzić, że mechanizmy przekazywania sygnałów przez receptory prowadzą pośrednio lub bezpośrednio do aktywacji układu kinaz i fosfataz białkowych oraz czynników transkrypcyjnych i ekspresji swoistych genów. W przypadku receptorów błonowych najprostszym systemem przeniesienia sygnału i indukcji reakcji komórki jest zmiana przepuszczalności błony komórkowej (receptory jonotropowe). W przypadku receptorów odpowiedzialnych za aktywację przemian metabolicznych przeniesienie (transdukcja) sygnału przez błonę zachodzi z udziałem heterotrimerycznych białek G (receptory metabotropowe dla hormonów) lub kinaz/fosfataz tyrozynowych (receptory dla cytokin). Przeniesienie sygnału może również zachodzić z udziałem receptorowych kinaz serynowo-treoninowych lub białek adaptorowych. Wymienione czynniki transdukcyjne przenoszą sygnał, indukując syntezę informatorów wtórnych: induktorów efektorowych kinaz i fosfataz serynowo-treoninowych, lub bezpośrednio aktywując czynniki transkrypcyjne. Najprostszy system aktywacji ekspresji genów prezentują receptory jądrowe, będące jednocześnie czynnikami transkrypcyjnymi.

Rozważając mechanizmy przekazywania sygnałów przez receptory w kontekście indukcji swoistych reakcji komórkowych, należy pamiętać, że zawsze są one wypadkową wielu różnych informacji jednoczasowo odbieranych przez komórki, warunków środowiska, dostępności określonych enzymów i czynników transkrypcyjnych oraz ich wzajemnych oddziaływań i funkcji, fenotypu i stopnia zróżnicowania komórek. Trzeba także podkreślić, że w wielu przypadkach brak informacji jest również istotnym sygnałem, który może indukować odpowiednią reakcję komórki.

Przekazywanie sygnałów przez synapsy

Wprowadzenie

Komórka nerwowa może tworzyć połączenia synaptyczne z neuronami lub innymi komórkami efektorowymi. Wyróżnia się dwa rodzaje połączeń synaptycznych. Są to **synapsy elektryczne** i **synapsy chemiczne**. Chociaż wymienione rodzaje synaps różnią się zarówno budową, jak i sposobem przekazywania impulsów, to jednak w obydwu przypadkach znajdują się w nich wyspecjalizowane obszary błon komórkowych, w których sygnał z komórki presynaptycznej jest przekazywany do komórki postsynaptycznej. W synapsach elektrycznych zmiany potencjału błony presynaptycznej są przekazywane **bezpośrednio na błonę postsynaptyczną**. W synapsach chemicznych natomiast potencjał czynnościowy powoduje **uwolnienie z zakończeń presynaptycznych substancji chemicznej,** zwanej **neurotransmiterem**. Następuje więc zamiana nośnika informacji. Neurotransmiter dyfunduje przez szczelinę synaptyczną i, reagując ze swoistym receptorem, powoduje otwarcie lub zamknięcie kanałów dla określonych jonów, czyli zmianę potencjału elektrycznego błony postsynaptycznej (depolaryzację lub hiperpolaryzację).

Budowa synapsy chemicznej

W skład budowy synapsy chemicznej wchodzą trzy zasadnicze elementy: **część presynaptyczna**, **szczelina synaptyczna** i **część postsynaptyczna** (ryc. 10.16).

Część presynaptyczną tworzy najczęściej kolbkowate zakończenie aksonu. W zakończeniu presynaptycznym synapsy chemicznej znajdują się pęcherzyki synaptyczne zawierające: neurotransmiter, mitochondria, nieliczne mikrotubule i lizosomy, a także neurofilamenty i sieć innych białek szkieletowych. Większość pęcherzyków synaptycznych gromadzi się w pobliżu błony presynaptycznej i obszar ten zwany jest **strefą czynną synapsy**.

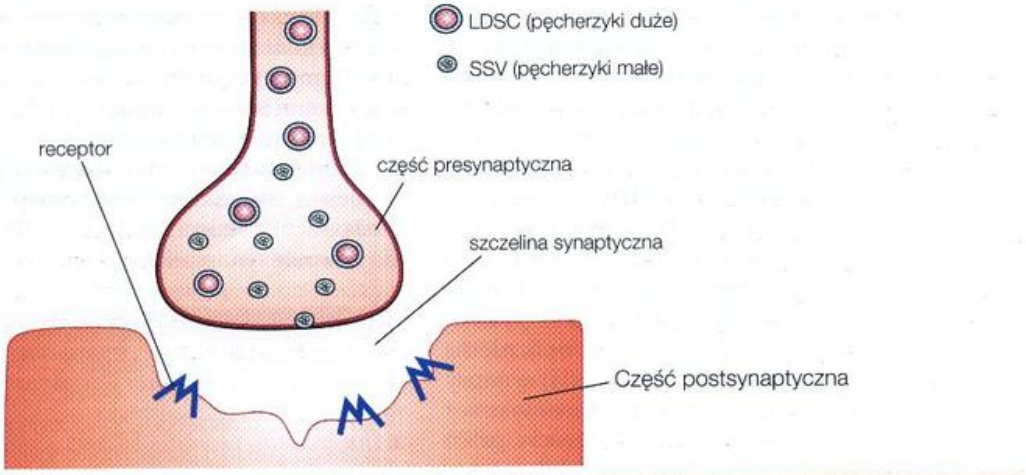
Szczelina synaptyczna o szerokości ok. 30 nm zawiera wiele białek macierzy pozakomórkowej, takich jak: laminina, cząsteczki adhezyjne i sieć włókienek kolagenowych. Białka te zapewniają zachowanie morfologicznej struktury synapsy i jej prawidłowe funkcjonowanie. Często są miejscem zakotwiczenia enzymów rozkładających uwolnione neurotransmitery.

Część postsynaptyczna jest zbudowana z wyspecjalizowanego odcinka błony komórkowej, zwanego błoną postsynaptyczną. Często ma ona liczne pofałdowania. W błonie postsynaptycznej są umiejscowione białka receptorowe dla neurotransmiterów.

W cytoplazmie sąsiadującej z błoną postsynaptyczną obserwuje się najczęściej nagromadzenie mitochondriów, zbiorników siateczki śródplazmatycznej gładkiej, a także rybosomów.

W zależności od rodzaju synapsy ultrastruktura poszczególnych jej składników może być zróżnicowana. Dotyczy to zwłaszcza liczby, wielkości i rozmieszczenia pęcherzyków synaptycznych, szerokości szczeliny synaptycznej, a także zagęszczeń na błonie postsynaptycznej (odpowiadających miejscom rozmieszczenia białek receptorowych).

Większość połączeń synaptycznych wykazuje typową budowę. Istnieją jednak połączenia sy-

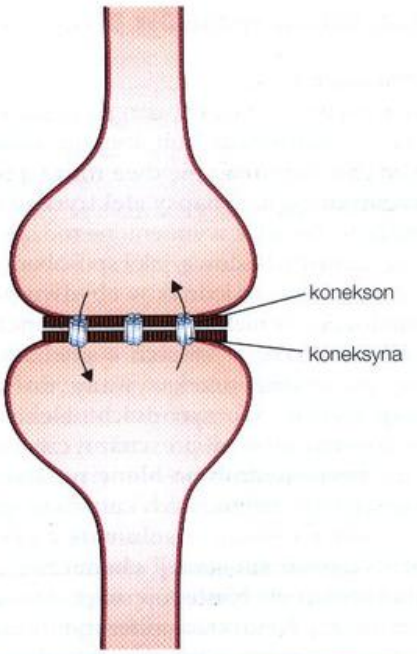


Rycina 10.16 Budowa synapsy chemicznej.

naptyczne o znacznie zróżnicowanej morfologii – w każdym przypadku determinującej ich funkcjonowanie. Do takich połączeń międzykomórkowych należy połączenie synaptyczne, w którym jedno zakończenie presynaptyczne aksonu kontaktuje się z komórką docelową przez synapsę zarówno chemiczną, jak i elektryczną. Są to **synapsy mieszane**. Opisano je m.in. w jądrach śródmózgowia. Innym rodzajem połączeń jest **synapsa „na odległość"**. W tym przypadku zakończenie presynaptyczne aksonu znajduje się w znacznej odległości od komórki docelowej. Wydzielony neurotransmiter wraz z płynem tkankowym dociera jednocześnie do wielu komórek efektorowych. Taki rodzaj kontaktu istnieje między komórką nerwową a komórkami mięśni gładkich lub komórkami gruczołowymi. W tego rodzaju połączeniach brak morfologicznie zróżnicowanej części postsynaptycznej. Rzadko spotykaną formą kontaktu synaptycznego jest **synapsa dwukierunkowa** opisywana m.in. między komórkami kłębka tętnicy szyjnej. Zagęszczenie presynaptyczne i obecność pęcherzyków synaptycznych stwierdza się w tego typu połączeniach w obydwu częściach synapsy (presynaptycznej i postsynaptycznej), w pewnej jednak od siebie odległości.

Synapsy elektryczne

Synapsy elektryczne (ang. *gap junction*) są miejscami bezpośredniego przekazywania informacji między neuronami za pomocą prądu jonowego. Odległość między błoną presynaptyczną i postsynaptyczną wynosi zaledwie ~2 nm. Ciągłość między elementem pre- i postsynaptycznym jest utrzymana dzięki kanałom zwanym **koneksonami**. Kanały te są zbudowane z białka zwanego **koneksyną** (ryc. 10.17). Wskutek swobodnego przepływu jonów przez kanały koneksonów proces depolaryzacji błony presynaptycznej jest przekazywany natychmiast na błonę postsynaptyczną, umożliwiając powstanie na niej potencjału czynnościowego. Obecność tego rodzaju synaps umożliwia znacznie szybsze przekazywanie sygnałów między komórkami. Synapsy elektryczne są symetryczne i informacja może być **przekazywana dwukierunkowo**. Dlatego też każdy z neuronów może być zarówno pre-, jak i postsynaptyczny. Bezpośrednie przekazywanie impulsu wyklucza istnienie **opóźnienia synaptycznego** charakterystycznego dla synapsy chemicznej. Proces przekazywania impulsów przez synapsę elektryczną może być modulowany przez miejscowe zmiany w koncentracji Ca^{2+} lub też np. przez efekt działania chemicznej substancji przekaźnikowej na pozasynaptyczny obszar błony neuronu. Zjawisko współdziałania w przekazywaniu informacji przez synapsę chemiczną i elektryczną jest jeszcze słabo poznane. Synapsy elektryczne są w większości synapsami pobudzającymi, w niektórych przypadkach mogą jednak pełnić funkcję hamującą.



Rycina 10.17 Budowa synapsy elektrycznej.

U kręgowców obecność synaps elektrycznych stwierdza się w wielu obszarach ośrodkowego układu nerwowego zarówno między neuronami, jak i między komórkami glejowymi. Najczęściej pełnią funkcję w synchronizacji sieci neuronów. Ten typ kontaktu, znany jako **połączenie typu neksus** (ang. *gap junction*), istnieje także między innymi komórkami naszego organizmu. Liczba tego rodzaju kontaktów komórkowych jest znacznie większa w okresie embrionalnym. U osobników dorosłych zmniejsza się na korzyść synaps chemicznych. Uszkodzenie neuronów może indukować tworzenie nowych synaps elektrycznych.

Klinika

Zmiany w liczbie, rozmieszczeniu i funkcji synaps elektrycznych znaleziono w przebiegu niektórych schorzeń ośrodkowego i obwodowego układu nerwowego (niektóre postaci obwodowych neuropatii, migrena).

Funkcjonowanie synapsy chemicznej

Bez względu na różnice w szczegółach dotyczących funkcjonowania różnego rodzaju synaps chemicznych ogólny schemat ich działania jest następujący:

1. Potencjał czynnościowy neuronu presynaptycznego
↓
2. Depolaryzacja błony presynaptycznej
↓
3. Fuzja pęcherzyków synaptycznych z błoną presynaptyczną
↓
4. Wydzielanie neurotransmitera
↓
5. Związanie neurotransmitera z receptorem postsynaptycznym
↓
6. Otwarcie lub zamknięcie kanałów jonowych błony postsynaptycznej
↓
7. Zmiana potencjału błony postsynaptycznej
↓
8. Rozprzestrzenianie się potencjału czynnościowego na błonie postsynaptycznej

Depolaryzacja błony presynaptycznej jest nieodzownym warunkiem uwolnienia neurotransmitera. Wynikiem związania uwolnionej substancji z receptorem jest zmiana przepuszczalności błony postsynaptycznej dla określonych jonów i pojawienie się **postsynaptycznego potencjału czynnościowego**.

Cechą charakterystyczną potencjałów postsynaptycznych jest ich stopniowanie, a więc zależność amplitudy od natężenia bodźca. Na obszarze synapsy chemicznej może dochodzić do pobudzenia – **synapsy pobudzające,** oraz do hamowania przekazywanych impulsów – **synapsy hamujące**.

W pierwszym przypadku dochodzi na ogół do depolaryzacji błony postsynaptycznej i wyzwolenia **postsynaptycznych potencjałów pobudzających** (ang. EPSPs – *excitatory postsynaptic potentials*), w drugim do hiperpolaryzacji błony i powstania tzw. **postsynaptycznych potencjałów hamujących** (ang. IPSPs – *inhibitory postsynaptic potentials*). Czynnikiem decydującym o wystąpieniu EPSP lub IPSP jest **rodzaj uwalnianego neurotransmitera** oraz **specyficzność receptorów błony postsynaptycznej**.

Czynność synapsy chemicznej charakteryzuje się następującymi zjawiskami: 1. **opóźnieniem synaptycznym**, 2. **sumowaniem w czasie**, 3. **sumowaniem przestrzennym**.

Opóźnienie synaptyczne zależy od czasu potrzebnego do: otwarcia kanałów wapniowych, uwolnienia neurotransmitera, dyfuzji przez szczelinę synaptyczną i reakcji neurotransmitera z receptorem postsynaptycznym. W zależności od rodzaju synapsy opóźnienie to waha się w granicach od 0,5 do kilku milisekund.

Sumowanie w czasie oznacza możliwość nakładania się potencjałów podprogowych aż do osiągnięcia stopnia depolaryzacji wyzwalającej potencjał czynnościowy. Kolejne potencjały podprogowe muszą być oczywiście przekazywane w bardzo krótkich odstępach czasu. Wystąpienie takiego potencjału czynnościowego jest możliwe jedynie w pojedynczej synapsie. Jeżeli natomiast jedna komórka nerwowa odbiera jednoczasowo wiele podprogowych impulsów presynaptycznych, mogą być one dodawane aż do uzyskania wartości progowej depolaryzacji. W takim przypadku występuje sumowanie przestrzenne.

Neurotransmitery

Neurotransmiterami mogą być związki chemiczne o bardzo różnej budowie, które spełniają następujące warunki: 1. są syntetyzowane w neuronie i zlokalizowane w pęcherzykach synaptycznych, 2. uwalniane są w sposób zależny od jonów wapnia pod wpływem bodźca powodującego depolaryzację błony presynaptycznej, 3. wiążąc się z receptorem, wywołują określoną zmianą polaryzacji błony postsynaptycznej, 4. ich unieczynnienie odbywa się w ściśle określonym czasie umożliwiającym powrót do stanu spoczynkowego błony postsynaptycznej.

Do substancji spełniających większość warunków określonych dla neurotransmitera zalicza się obecnie: **neurotransmitery klasyczne** – związki chemiczne o niewielkiej cząsteczce syntetyzowane w komórkach nerwowych, **neuropeptydy** (najczęściej pełnią rolę neuromodulatorów) – związki o znacznie większej cząsteczce niż neurotransmitery klasyczne; syntetyzowane są w neuronach, a także w komórkach innych tkanek (głównie w komórkach wydzielania wewnętrznego).

Funkcję neurotransmiterów pełnią także zasady purynowe, NO, CO i ATP. Najdokładniej poznaną grupą neurotransmiterów są neurotransmitery klasyczne, do których należą m.in.: acetylocholina (ACh), noradrenalina (NA), serotonina (5-HT), histamina (His), glicyna (Gly), dopamina (DA), kwas γ-aminomasłowy (GABA), kwas α-glutaminowy (Glu) i kwas asparaginowy (Asp). Jak wspomniano wyżej, rolę neurotransmiterów pełnić mogą również neuroaktywne peptydy (neuropeptydy).

Do najlepiej poznanych neuropeptydów należą: substancja P, neurotensyna, VIP (ang. *vasoactive intestinal peptide*), tyreoliberyna, wazopresyna, oksytocyna, galanina, somatostatyna, luliberyna, grelina, CART (ang. *cocaine amphetamine-regulated transcript*), peptydy opioidowe (enkefaliny, endorfiny, dynorfina) itd. Liczba peptydów mogących pełnić rolę neurotransmiterów jest znacznie większa (obecnie wyizolowano kilkadziesiąt substancji pełniących tę funkcję) i rośnie w miarę uzyskiwania nowych szczegółów dotyczących funkcjonowania układu nerwowego. Jak wynika choćby z powyższego zestawienia, neurotransmiterami mogą być związki, które pełnią zupełnie inne funkcje także poza układem nerwowym.

Lokalizacja neurotransmiterów w zakończeniach presynaptycznych

Klasyczne neurotransmitery gromadzone są w **pęcherzykach małych**, jasnych o średnicy ok. 20–60 nm (ang. SSVs – *small synaptic vesicles*), a neuropeptydy w **pęcherzykach dużych**, gęstych o średnicy powyżej 60 nm (ang. LDSVs – *large dense core vesicles*). Aminy biogenne mogą być lokalizowane zarówno w jednych, jak i drugich rodzajach pęcherzyków.

Większość zakończeń presynaptycznych zawiera różne rodzaje pęcherzyków. Różne jest także rozmieszczenie pęcherzyków zawierających przekaźnik w obrębie zakończenia presynaptycznego. Pęcherzyki jasne są zgrupowane w pobliżu błony presynaptycznej w obrębie strefy czynnej synapsy. Lokalizacja pęcherzyków dużych, gęstych jest przypadkowa, tzn. mogą znajdować się w różnych miejscach części presynaptycznej synapsy.

Neurotransmitery pobudzające i hamujące

Ustalenie, czy dany neurotransmiter jest zaliczany do pobudzających czy hamujących, zależy od typu kanału jonowego błony postsynaptycznej, który zostanie otwarty pod wpływem aktywacji określonego receptora. Jeżeli na skutek związania neurotransmitera z receptorem zostaną otwarte np. kanały sodowe lub, jak w przypadku synapsy nerwowo-mięśniowej, kanały sodowo-potasowe, spowoduje to depolaryzację błony, będzie to więc efekt pobudzający. Jeśli natomiast na skutek wspomnianej interakcji otwarte zostaną kanały dla Cl^- lub wolne kanały K^+, dojdzie do hiperpolaryzacji błony, czyli hamowania impulsu. Paradoksalnie w neuronach siatkówki otwarcie kanałów dla Cl^- ma efekt pobudzający. Jak już wspomniano, działanie danego neurotransmitera może być różne w zależności od typu receptora. Przykładem jest odmienne działanie acetylocholiny. Jej związanie się z receptorem nikotynowym (receptor dla ACh pobudzany przez nikotynę) komórki mięśnia szkieletowego powoduje depolaryzację obszaru płytki motorycznej, a pobudzenie przez ACh receptora muskarynowego (receptor dla ACh pobudzany przez muskarynę) daje efekt hamowania na błonie komórki mięśnia sercowego. Przyjmuje się jednak, że funkcje neurotransmiterów pobudzających pełnią przede wszystkim: glutaminian (kwas α-glutaminowy), asparaginian (kwas asparaginowy), ACh, noradrenalina, serotonina, dopamina, substancja P. Funkcję hamującą pełnić mają przede wszystkim glicyna i kwas γ-aminomasłowy (GABA).

Neurotransmitery różnią się między sobą sposobem lokalizacji w zakończeniu presynaptycznym, miejscem syntezy w neuronie, sposobem degradacji, a także, jak już wspomniano, sposobem oddziaływania z receptorem.

Biosynteza neurotransmiterów

Biosynteza poszczególnych typów neurotransmiterów odbywa się w różnych miejscach komórki nerwowej. Enzymy konieczne do syntezy neurotransmiterów klasycznych są rozmieszczone zarówno w ciele komórki nerwowej, jak i w zakończeniach presynaptycznych, gdzie aktywność ich jest znacznie większa. Neuropeptydy natomiast są syntetyzowane w siateczce śródplazmatycznej szorstkiej – głównie więc w perikarionie. Do zakończeń presynaptycznych przedostają się za pomocą transportu aksonalnego. Różny sposób syntezy różnych neurotransmiterów ma więc także swój udział w selektywnym określaniu odpowiedzi synapsy na różnego rodzaju bodźce.

Uwalnianie neurotransmiterów

Chemiczne substancje przekaźnikowe są uwalniane z pęcherzyków synaptycznych w wyniku egzocytozy w postaci tzw. **pakietów** (*quanta*). Każdy pakiet zawiera określoną liczbę cząsteczek neurotransmitera, np. jeden pakiet (*quantum*) acetylocholiny uwalniany z zakończenia presynaptycznego synapsy nerwowo-mięśniowej zawiera 10 000 cząsteczek. W zależności od rodzaju impulsu uwalnia się zawsze określona liczba pakietów, a co za tym idzie, ściśle określona liczba cząsteczek neurotransmitera. Uwalnianie neurotransmitera w bardzo niewielkich ilościach odbywa się spontanicznie bez zaistniałej stymulacji, a jego interakcja z receptorem warunkuje pojawienie się **miniaturowych potencjałów postsynaptycznych**. Uważa się, że taki stopień depolaryzacji jest wywołany uwolnieniem jednego

pakietu neurotransmitera. Jest on oczywiście niewystarczający do wywołania potencjału czynnościowego, ale stałe uwalnianie neurotransmiterów jest konieczne do utrzymania aktywności synapsy.

Cały ten złożony proces jest regulowany przez wiele białek błonowych zarówno błon pęcherzyków synaptycznych, jak i błony presynaptycznej. Proces uwalniania neurotransmitera z pęcherzyków synaptycznych odbywa się w kilku etapach i dotyczy mechanizmów związanych z: 1. transportem (mobilizacją) puli pęcherzyków do strefy aktywnej synapsy, 2. zakotwiczeniem pęcherzyków w bezpośredniej bliskości błony presynaptycznej, 3. fuzją błony pęcherzyków z błoną presynaptyczną, 4. recyrkulacją błon pęcherzyków po zakończeniu procesu egzocytozy (ryc. 10.18). Każdy etap tego procesu regulowany jest przez swoiste białka cytoplazmatyczne oraz białka błonowe zarówno błon pęcherzyków synaptycznych, jak i błony presynaptycznej (tab. 10.6).

W mobilizacji puli pęcherzyków synaptycznych uczestniczy **synapsyna I**, cytoplazmatyczne białko, mające właściwości krzyżowego wiązania się zarówno z F-aktyną, jak też z błoną pęcherzyków synaptycznych. Aktywność wiązania jest regulowana przez fosforylację tego białka. Obecność nieufosforylowanej synapsyny I na granicy aksonu i jego zakończenia presynaptycznego umożliwia związanie z F-aktyną rezerwowej puli pęcherzyków transportowanych wzdłuż aksonu w pewnej odległości od strefy czynnej synapsy. Pobudzenie aksonu jest bodźcem do ufosforylowania synapsyny I (z udziałem kinazy zależnej od Ca^{2+}/kalmoduliny) i uwolnienia pęcherzyków synaptycznych.

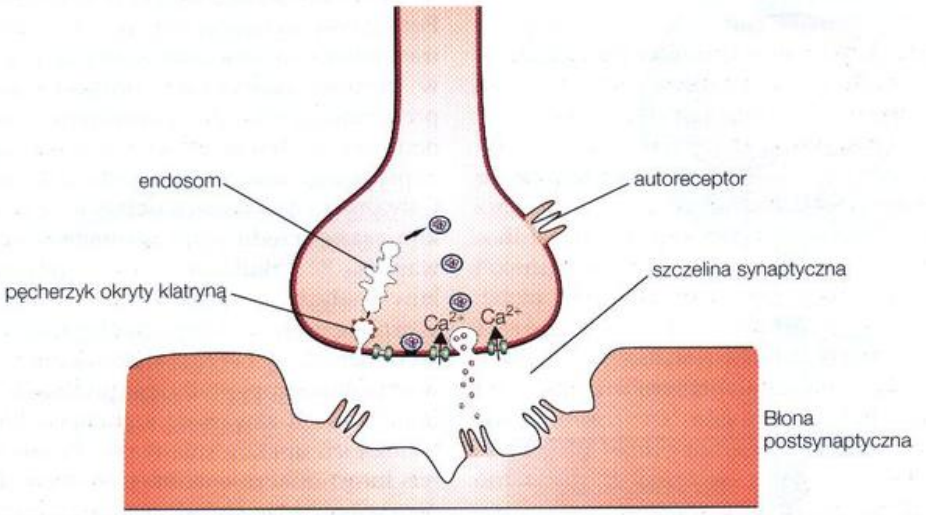
W procesie kotwiczenia w strefie czynnej synapsy i fuzji pęcherzyków synaptycznych z błoną presynaptyczną uczestniczą zarówno białka błony pęcherzyków synaptycznych, **synaptotagmina** i **synaptobrewina (VAMP)**, jak też białka błony presynaptycznej – **syntaksyna** i **SNAP-25**.

Synaptotagmina jest białkiem wykazującym znaczne powinowactwo do jonów wapnia, pozostałe białka tworzą natomiast nieodzowny do kotwiczenia pęcherzyków synaptycznych i ich fuzji z błoną presynaptyczną kompleks białkowy nazwany **SNARE** (ang. *soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor (NSF) attachment protein receptor*) (ryc. 10.19).

Za badania nad opisanymi powyżej zjawiskami i odkrycie mechanizmów fuzji pęcherzyków Szwedzka Akademia Nauk uhonorowała w 2013 roku Nagrodą Nobla Jamesa Rothmana, Randy'ego Scheckmana i Thomasa Südhofa.

KLINIKA

Dodatkowym dowodem potwierdzającym rolę kompleksu SNARE w uwalnianiu neurotransmiterów jest mechanizm działania toksyn wytwarzanych przez bakterie z rodziny *Clostridium* (toksyny tężcowej i pewnych rodzajów toksyn botulinowych). Łańcuchy lekkie tych toksyn są endoproteazami powodującymi rozkład poszczególnych białek kompleksu SNARE. Efektem działania wymienionych toksyn jest więc zahamowanie przewodnictwa na poziomie synaps.



Rycina 10.18 Uwalnianie neurotransmiterów (opis w tekście).

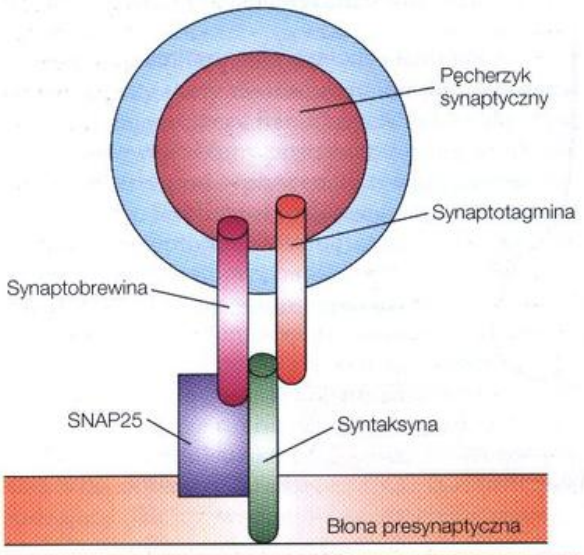
Tabela 10.6 Funkcja białek pęcherzyków synaptycznych w regulacji procesu transmisji synaptycznej

Rodzaje białka	Funkcja
Białko transportujące neurotransmiter	umożliwia wychwyt zwrotny neurotransmitera
Synapsa I	krzyżowo wiąże się z błoną pęcherzyków i F-aktyną
Kinaza II zależna od C^{a2}+/kalmoduliny	fosforyluje synapsę I
Synaptotagmina	oddziałuje z syntaksyną (współdziała w kotwiczeniu, fuzji i endocytozie pęcherzyków), wrażliwa na Ca^{2+}
Synaptobrewina	oddziałuje z syntaksyną i SNAP-25 w procesie kotwiczenia i fuzji pęcherzyków
Synaptofizyna	uczestniczy w tworzeniu kanałów (pory) błonowych?

W procesie fuzji błon pęcherzyków z błoną presynaptyczną postuluje się także udział **synaptofizyny** – białka mającego uczestniczyć w tworzeniu kanałów błonowych (pory), przez które neurotransmiter jest uwalniany do szczeliny synaptycznej.

W każdym etapie złożonego mechanizmu, związanego z uwolnieniem neurotransmitera, niezbędny jest udział jonów wapnia. Odpowiednie – bardzo wysokie stężenie Ca^{2+} osiągane w bardzo krótkim czasie (< 200 μs) – wydaje się nieodzowne do wystąpienia fuzji pęcherzyków synaptycznych z błoną presynaptyczną.

Wysokie stężenie jonów wapnia obserwuje się tylko w najbliższym sąsiedztwie kanałów wapniowych. W tych właśnie obszarach są kotwiczone pęcherzyki synaptyczne przygotowane do natychmiastowego uwolnienia neurotransmitera. Taka lokalizacja pęcherzyków jest wynikiem interakcji między kanałami wapniowymi i syntaksyną.



Rycina 10.19 Budowa kompleksu SNARE.

Neurotransmiter może być także uwalniany z neuronu poza obszarem zakończenia synaptycznego. W wielu aksonach, szczególnie uwalniających aminy biogenne, obserwuje się występowanie tzw. żylakowatości (miejsca bańkowatego rozszerzenia aksonu) zawierających pęcherzyki synaptyczne. Z tego miejsca neurotransmiter jest uwalniany do przestrzeni międzykomórkowej i w wyniku dyfuzji może aktywować receptory znajdujące się w znacznej odległości. Taki sposób przekaźnictwa określa się mianem pozasynaptycznej transmisji objętościowej. Jak się wydaje, współdziała on w procesie modulacji klasycznego przekaźnictwa synaptycznego. Sposób uwalniania neurotransmiterów zależy od czasu trwania impulsu, a także od jego częstotliwości. Neurotransmitery klasyczne są uwalniane przy niskiej częstotliwości rzędu 1–10 Hz, uwalnianie przekaźników peptydowych wymaga natomiast częstotliwości 5–40 Hz. Przy wysokiej częstotliwości impulsu może więc być uwalniany zarówno neurotransmiter klasyczny, jak i neuropeptyd.

Recyrkulacja pęcherzyków synaptycznych

Pęcherzyki synaptyczne po uwolnieniu neurotransmitera są otaczane klatryną i, podobnie jak w procesie endocytozy, odrywają się od błony presynaptycznej. Po ponownym „napełnieniu" neurotransmiterem w obrębie zakończenia presynaptycznego powracają do strefy czynnej synapsy. Cały proces recyrkulacji odbywa się w bardzo krótkim czasie (rzędu ms) i wymaga obecności jonów wapnia. Recyrkulacja dotyczy jedynie pęcherzyków małych jasnych (SSVs), zawierających klasyczne neurotransmitery podlegające wychwytowi zwrotnemu. Pęcherzyki duże ciemne (LDSVs), zawierające neuropeptydy, nie podlegają recyrkulacji, ponieważ ich zawartość wymaga syntezy nowych białek i ich upakowania w pęcherzyki w perikarionie. Inny – znacznie wolniejszy – proces uwalniania neuropeptydów świadczy dodatkowo, iż są one regulatorami procesu transmisji synaptycznej.

Unieczynnianie neurotransmiterów

Sposób i szybkość unieczynniania neurotransmiterów ma ogromne znaczenie w procesie prawidłowego przesyłania informacji przez synapsę. Zablokowanie receptorów przez neurotransmiter czy też jego niepożądana dyfuzja do komórek sąsiadujących może zaburzać prawidłowe funkcjonowanie synapsy – przede wszystkim mogą wystąpić zmiany w synaptycznym sumowaniu czasowym i przestrzennym.

Unieczynnianie substancji przekaźnikowych może odbywać się na kilka sposobów, Jednym z nich jest degradacja enzymatyczna przez odpowiednią dla określonego neurotransmitera hydrolazę. Przykładem jest tu działalność esterazy acetylocholinowej (AChE), która rozkłada acetylocholinę na cholinę i kwas octowy.

KLINIKA

Wiele toksycznych gazów, m.in. gazy bojowe, wiąże się z miejscem aktywnym AChE, blokując jej działanie. Doprowadza to do blokady receptorów cholinergicznych płytki motorycznej przez ACh, uniemożliwia więc przekazywanie następnych impulsów do komórki mięśniowej. Niepełna, dawkowana blokada miejsc aktywnych AChE jest jednak stosowana np. w leczeniu zespołu różnych schorzeń określanych jako miastenia (schorzenie o podłożu autoimmunologicznym). W chorobach tych przedłużona obecność ACh na receptorze błony komórki mięśniowej zasłania konkurencyjnie miejsca receptorowe przed wiązaniem ich z przeciwciałami skierowanymi przeciw własnemu białku receptora (autoprzeciwciała).

Punktem uchwytu niektórych leków stosowanych w leczeniu pewnych chorób związanych z zaburzeniem funkcji układu dopaminergicznego lub serotonergicznego (np. depresja, choroba Parkinsona) są właśnie enzymy zaangażowane w unieczynnianie katecholamin.

Wiele klasycznych neurotransmiterów, głównie katecholaminy jest zwrotnie wychwytywanych przez swoisty system białek transportujących (zależnych od Na^+), związanych z błoną pęcherzyków synaptycznych i błoną presynaptyczną. Zablokowanie białek transportujących zaangażowanych w proces wychwytu zwrotnego katecholamin – głównie dopaminy, jest właśnie efektem działania wielu narkotyków, m.in. kokainy i amfetaminy.

Neuropeptydy unieczynniane są albo przez enzymy proteolityczne, albo też w wyniku dyfuzji. Mogą oddziaływać ponownie zarówno na autoreceptory, jak też na inne komórki nietworzące bezpośrednich połączeń synaptycznych z komórkami uwalniającymi tę właśnie substancję przekaźnikową. Proces rozkładu enzymatycznego neuropeptydów jest także nieswoisty, ponieważ jeden rodzaj enzymów może rozkładać kilka różnych neurotransmiterów neuropeptydowych. Ponadto w wyniku ich enzymatycznej degradacji mogą powstawać inne, biologicznie czynne związki.

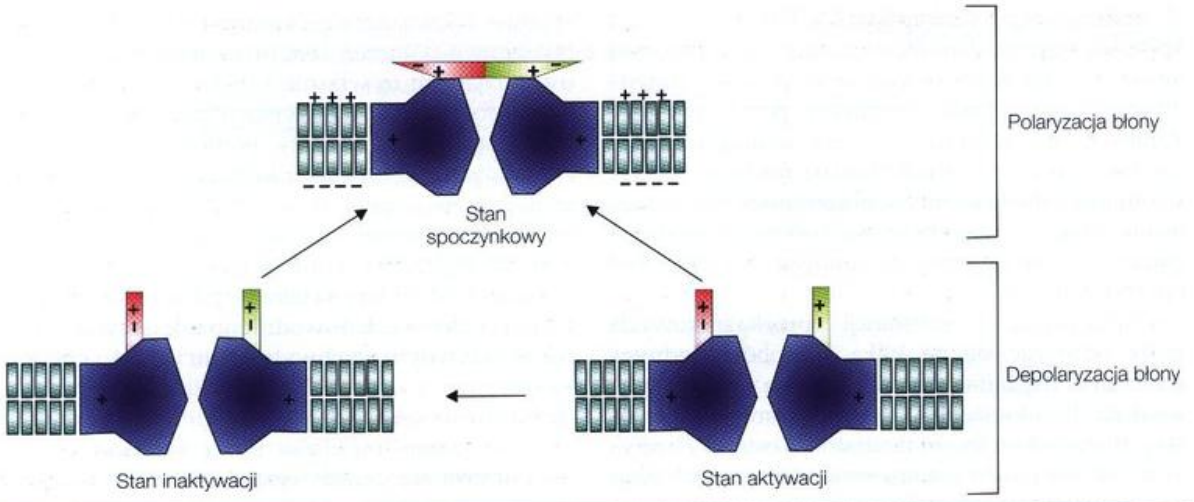
Neurotransmitery są także wychwytywane przez komórki glejowe. Udowodniono udział tych komórek w aktywnym wychwytywaniu GABA i glicyny.

Kanały jonowe

Przekazywanie impulsów przez komórki nerwowe odbywa się dzięki wykorzystaniu białkowych kanałów jonowych, które umożliwiają wymianę jonów – głównie Na^+, Ca^{2+}, K^+, Cl^-, H^+ – między cytoplazmą i środowiskiem zewnętrznym neuronów. Kanały jonowe są selektywne dla określonych jonów. Udowodniono także istnienie różnych typów kanałów dla poszczególnych jonów. Otwarcie lub zamknięcie tych kanałów może być stymulowane: zmianą napięcia (ładunku elektrycznego), związaniem ligandu zewnątrzkomórkowego (neurotransmitera) lub wewnątrzkomórkowego (głównie jonów Ca^{2+} lub cAMP, a także IP_3), mechanicznie (rozciąganie lub ściskanie).

Białkowe kanały jonowe mogą znajdować się w trzech różnych stanach konformacyjnych: spoczynkowym, aktywacji i inaktywacji (ryc. 10.20). Powstająca pod wpływem zaistniałego impulsu różnica stężeń określonych jonów doprowadza do zmiany potencjału spoczynkowego błony i powstania potencjału czynnościowego, który następnie może być przekazywany (propagowany) wzdłuż błony komórkowej. Ze względu na znaczny udział jonów Na^+ w procesach pobudliwości komórek, struktura i funkcja kanału dla tego jonu jest najlepiej poznana. Przyjmuje się, że powstanie potencjału czynnościowego zależy przede wszystkim od zmiany ładunku elektrycznego kanałów sodowych i wapniowych (napięciowozależnych). Potencjał spoczynkowy błony jest ustalany głównie dzięki funkcjonowaniu kanałów potasowych (typ K^+ – ang. *leak channels*).

Czynność kanałów jonowych zależnych od neurotransmitera umożliwia szybką zamianę sygnału chemicznego na elektryczny. Lokalna zmiana potencjału błony, zainicjowana przez uczynnienie omawianych kanałów, zależy od ilości uwolnionego neurotransmitera i czasu jego oddziaływania z receptorem. Wielkość zmiany potencjału błony



Rycina 10.20 Różne stany konformacyjne kanałów jonowych.

musi być wystarczająca do otwarcia dostatecznej liczby sąsiadujących kanałów napięciowozależnych, czyli do powstania postsynaptycznego potencjału czynnościowego i jego propagacji.

Receptory dla neurotransmiterów

Jak wspomniano wyżej, odpowiedź komórki docelowej może być zainicjowana przez związanie się cząsteczki sygnałowej (neurotransmitera) z receptorem. Receptorami dla neurotransmiterów są białka błon komórkowych znajdujące się w błonie postsynaptycznej, ale także w błonie presynaptycznej synapsy. Te ostatnie mogą być zarówno **autoreceptorami** (receptory dla neurotransmitera uwalnianego z danego zakończenia nerwowego), jak też **heteroreceptorami** (dla neurotransmitera uwalnianego z zakończenia presynaptycznego innego neuronu).

Receptorami dla neurotransmiterów są:

1. **receptory jonotropowe** – kanały jonowe, uczestniczące w szybkim, bezpośrednim przekazywaniu informacji z komórki do komórki;
2. **receptory metabotropowe** – reagujące z katecholaminami i neuropeptydami, regulujące czynność kanałów jonowych pośrednio przez białka G.

Zaznaczyć należy, że niektóre neurotransmitery mogą działać jednocześnie na różne typy receptorów. Przykładem takiego działania jest istnienie dwóch typów receptorów dla acetylocholiny: receptora nikotynowego będącego białkiem kanałowym i receptora muskarynowego działającego przez związanie się z białkiem G.

Receptory jonotropowe

Jest to rodzina receptorów związanych z szybkim, bezpośrednim przekazywaniem informacji z komórki do komórki. Najwcześniej i najlepiej poznanym receptorem jest **receptor nikotynowy** dla acetylocholiny. Składa się z pięciu podjednostek (dwóch podjednostek α, oraz podjednostek β, γ, δ) zbudowanych z szeregów aminokwasów, których obszary hydrofobowe przechodzące przez całą szerokość błony tworzą kanał jonowy. Dwie podjednostki α mają hydrofilowe miejsca wiążące ACh. Nawet niewielkie różnice w składzie aminokwasów poszczególnych podjednostek czy też zastąpienie jednej podjednostki inną mogą zmienić niektóre właściwości receptora, jak np. swoistość wiązania się z określonym ligandem. Dotychczas zidentyfikowano np. siedem typów podjednostki α i trzy typy podjednostki β. Świadczy to o heterogenności receptora nikotynowego dla ACh.

Postęp w badaniach nad receptorami jonotropowymi przyczynił się do wykrycia podobieństwa struktury receptorów dla kwasu γ-aminomasłowego, glicyny i serotoniny do receptora nikotynowego dla ACh. Receptory te składają się także z kilku podjednostek i zawierają zarówno miejsce wiążące neurotransmiter, jak i kanały jonowe. Poszczególne podjednostki tych receptorów, podobnie jak w przypadku receptora nikotynowego dla ACh, występują w wielu odmianach. Obliczono, że zmieniając strukturę znanych już podjednostek, można by teoretycznie skonstruować 4410 typów receptora nikotynowego dla ACh i tyleż samo typów receptora dla GABA. Receptor

dla określonego neurotransmitera może mieć więc zupełnie inne właściwości w różnych strukturach anatomicznych układu nerwowego.

Receptory metabotropowe

Informatorami pierwotnymi uczestniczącymi w przekazywaniu informacji z udziałem receptorów metabotropowych są zarówno neurotransmitery klasyczne, jak i neuropeptydy. Wiążą się z receptorem niebędącym białkiem kanałowym. Uczynnienie kanałów jonowych zachodzi wówczas w sposób pośredni przez aktywację białek G. Białka te mogą bezpośrednio regulować funkcje kanałów lub też uruchamiać syntezę informatorów wtórnych, takich jak np.: DG, IP_3, cAMP. Podobnie jak w przypadku receptorów jonotropowych, może istnieć wiele różnych typów receptora metabotropowego dla danego neurotransmitera.

Przekazywanie sygnału z komórki do komórki z udziałem receptorów jonotropowych odbywa się bezpośrednio i szybko, odpowiedź komórki docelowej na sygnał przekazany przez receptor metabotropowy jest natomiast znacznie wydłużona w czasie.

Charakterystyczną i istotną cechą receptorów jest **możliwość samoregulacji czynności kanałów jonowych**. Dzięki tej właściwości może być np. regulowana liczba receptorów wrażliwych w danym momencie na związanie neurotransmitera. Udowodniono, że receptor nikotynowy dla ACh zlokalizowany w interneuronach mózgowia może samoistnie regulować zmiany swojej konformacji w zależności od stężenia acetylocholiny. Mówi się wtedy o niskim lub wysokim powinowactwie receptora do ligandu. Stan zwiększonej lub zmniejszonej pobudliwości receptora na dany neurotransmiter może być regulowany. Wiadomo już, że np. jony wapnia wzmagają pobudzające działanie receptora nikotynowego dla ACh w mózgu, a glicyna nasila działanie receptora dla glutaminianu. Takie właściwości receptora mogą zwiększać lub zmniejszać efektywność przekazywania sygnału przez synapsy. Przypuszcza się, że właśnie proces uczenia się zależy od stopnia efektywności przekazywania sygnału przez połączenie synaptyczne między dwoma jednocześnie pobudzonymi neuronami.

Regulacja przekazywania impulsów przez zakończenia presynaptyczne

Uwalnianie substancji przekaźnikowych jest regulowane w wielu przypadkach przez receptory znajdujące się w zakończeniu presynaptycznym synapsy. Wiele z tych receptorów pełni funkcje autoreceptorów, tzn. wiążą neurotransmiter uwalniany z tego samego zakończenia presynaptycznego, na którym są umiejscowione. Ponieważ większość zakończeń presynaptycznych uwalnia więcej niż jeden neurotransmiter, mechanizm regulacji odpowiedzi na poziomie presynaptycznym jest bardzo złożony i nie w pełni wyjaśniony. Dotychczasowe wyniki badań upoważniają do następujących ustaleń: 1. aktywacja presynaptycznego receptora regulującego (pobudzającego lub hamującego) uwalnianie jednego z neurotransmiterów może wpływać na uwalnianie innych współistniejących substancji przekaźnikowych, 2. istnieje więcej niż jeden typ autoreceptora dla danego neurotransmitera, 3. uwalnianie neuropeptydów odbywa sie z reguły pod kontrolą autoreceptora dla współistniejącego klasycznego neurotransmitera. Stwierdzono także istnienie autoreceptorów dla neuropeptydów, które kontrolują uwalnianie neurotransmiterów klasycznych.

Regulacja na poziomie presynaptycznym synapsy dotyczy przede wszystkim procesów hamowania i odbywa się przez zmniejszenie stężenia wewnątrzkomórkowego poziomu Ca^{2+} w synapsie pobudzającej w czasie trwania potencjału czynnościowego

Piśmiennictwo

Jantas D.: *Tyreoliberyna (TRH) – neuropeptydy regulujące homeostazę w ośrodkowym układzie nerwowym.* Post. Biol. Kom. 2009; 36(6), 483.

Kmieć Z.: *Związane ze starzeniem modyfikacje w działaniu hormonów uwarunkowane zmianami na poziomie receptorowym i efektorowym.* Post. Biol. Kom. 1999, 26, 57–68.

Koj A.: *Niektóre cytokiny przeciwzalapne: własności i mechanizmy działania.* Post. Biol. Kom. 2001, 28 supl. 16, 5–13.

Konarska L. (red.): *Molekularne mechanizmy przekazywania sygnałów w komórce.* Wyd. Nauk. PWN, Warszawa 1995.

Nowak J. Z., Zawilska J. B. (red.) *Receptory: struktura, charakterystyka, funkcja.* Wyd. Nauk. PWN, Warszawa 1997.

Pachówka M., Kluk M., Korczak-Kowalska G.: *Rola receptorów Toll-podobnych (TRL) w indukcji i regulacji.* Post. Biol. Kom. 2009; 36(3), 429.

Puzianowska-Kuźnicka M., Madej A., Krystyniak A. i wsp.: Trijodotyronina i jej receptory jądrowe w procesie nowotworzenia. Post. Biol. Kom. 2001, 28, 183–196.

Zarębski A.: *Niektóre inhibitory przekazu sygnału wewnątrzkomórkowego w hamowaniu syntezy cytokin.* Post. Biol. Kom. 2001, 28, supl. 16. 15–22.

ROZDZIAŁ 11

Cząsteczki adhezyjne i składnik substancji międzykomórkowej

Maciej Zabel, Jerzy Kawiak

HASŁA

Cząsteczki adhezyjne (CAM)

Grupa cząsteczek błon komórkowych odpowiedzialnych za adhezję i połączenia między komórkami lub z cząsteczkami substancji międzykomórkowej (ECM). Do CAM zalicza się: selektyny, kadheryny, integryny, IgCAM i inne. Część z nich tworzy struktury zwane połączeniami międzykomórkowymi.

Selektyny

Wiążą grupy cukrowe na powierzchni innych komórek i odgrywają ważną rolę w przechodzeniu leukocytów przez śródbłonek.

Kadheryny

Łączą się z kadherynami innych komórek, wytwarzając stabilne połączenia zwierające: obwódki przylegania i desmosomy. Desmogleiny są rodzajem kadheryn tworzących desmosomy.

Integryny

Umożliwiają łączenie się komórek z cząsteczkami ECM, m.in.: lamininą, fibronektyną i kolagenem. Tworzą połączenia zwierające: hemidesmosomy i przyczepy ogniskowe. Część integryn łączy się z IgCAM innych komórek, umożliwiając przechodzenie leukocytów i komórek nowotworowych przez ścianę naczyń krwionośnych.

IgCAM

Duża grupa CAM mająca domeny podobne do immunoglobulin. Tworzą połączenia homofilowe z IgCAM lub heterofilowe z innymi CAM. Tworzą przejściowe lub trwałe połączenia w układzie nerwowym i ułatwiają migrację komórek.

Połączenia międzykomórkowe

Stabilne, widoczne w mikroskopie elektronowym struktury między komórkami lub komórkami i ECM, np.: połączenia zamykające, zwierające i jonowo-metaboliczne.

Połączenia zwierające

Utworzone są przez kadheryny (między komórkami) lub integryny (komórki z ECM). W połączeniach tych występują białka cytoplazmatyczne łączące CAM z filamentami cytoszkieletu (kateniny, winkulina, talina i α-aktynina – filamenty aktynowe, oraz desmoplakiny – filamenty pośrednie). Połączenia te nadają dużą wytrzymałość mechaniczną komórkom i tkankom.

Cząsteczki substancji międzykomórkowej (cząsteczki ECM)

Duża grupa białek i wielocukrów, które odgrywają ważną rolę w umiejscowieniu komórek. Część z nich tworzy błony podstawne. Cząsteczki ECM mają domeny łączące je między sobą lub z komórkami, co umożliwia tworzenie tkanek i narządów. Do cząsteczek ECM należą przede wszystkim: GAG, proteoglikany, kolagen, fibronektyna i laminina.

GAG

Glikozaminoglikany (GAG) są wielocząsteczkowymi polimerami dwucukrów: heksozaminy i kwasu uronowego. Mają charakter polianionów wiążących duże ilości wody i elektrolitów. Są głównym składnikiem proteoglikanów, które mogą łączyć się z innymi cząsteczkami ECM.

Kolagen

Zasadnicze białko ECM, tworzące głównie włókna. Niektóre typy kolagenu wchodzą w skład błon podstawnych lub łączą włókna kolagenowe między sobą.

Fibronektyna

Glikoproteina ECM mająca domeny do łączenia z komórkami, kolagenem i GAG. Pośredniczy w łączeniu komórek z cząsteczkami ECM.

Laminina

Glikoproteina błon podstawnych łącząca integryny komórek z kolagenem typu IV, entaktyną i GAG. Pośredniczy w łączeniu komórek z błonami podstawnymi.

Ważnym krokiem w ewolucji było powstanie organizmów wielokomórkowych, w których komórki muszą być ze sobą odpowiednio połączone i razem współdziałać. Duże znaczenie w mechanizmie integracji komórkowej odgrywają cząsteczki błonowe na powierzchni komórek, zwane cząsteczkami adhezji komórkowej (CAM). Cząsteczki te rozpoznają się wzajemnie na powierzchniach komórek lub połączone są z elementami szkieletu komórkowego, co wraz z rozpoznawaniem komórek sąsiednich umożliwia ich migrację i odszukanie odpowiedniej pozycji w organizmie. Duża część komórek wydziela ponadto glikoproteiny i wielocukry. Makrocząsteczki te tworzą **substancję międzykomórkową** (ang. ECM – *extracellular matrix*) oraz umożliwiają łączenie się komórek w większe zespoły, zwane tkankami i narządami. Niektóre oddziaływania międzykomórkowe są trwałe, utworzone przez połączenia międzykomórkowe, inne są mniej stabilne, lecz odgrywają ważną rolę podczas rozwoju, różnicowania i migracji komórek. CAM oraz składniki ECM zaangażowane są w wielu procesach fizjologicznych i regeneracji tkanek oraz procesach patologicznych, takich jak powstawanie nowotworów i procesy zapalne.

Cząsteczki adhezyjne (ang. CAM – *cell adhesion molecules*)

Jest to duża grupa białek transbłonowych, których podstawową funkcją jest rozpoznawanie innych komórek lub cząsteczek międzykomórkowych oraz tworzenie z nimi trwałych lub przejściowych połączeń. Zalicza się do nich przede wszystkim: selektyny, integryny, kadheryny i białka z nadrodziny immunoglobulin (tab. 11.1). Czasami CAM dzieli się na dwie grupy: wapniowozależnych i wapniowoniezależnych. Do pierwszej grupy zalicza się kadheryny i selektyny, a do drugiej integryny i białka nadrodziny immunoglobulin.

Selektyny

Selektyny są grupą cząsteczek adhezyjnych, które wiążą grupy cukrowe swoistych glikoprotein i mucyn błonowych innych komórek. Ekspresja selektyn na błonie komórek nie jest cechą stałą, podlega szybkiej kontroli komórkowej i dlatego cząsteczki te mogą się szybko pojawiać się i zanikać z błony komórkowej. Najczęściej tworzą przejściowe połączenia (czasem bardziej trwałą adhezję) między

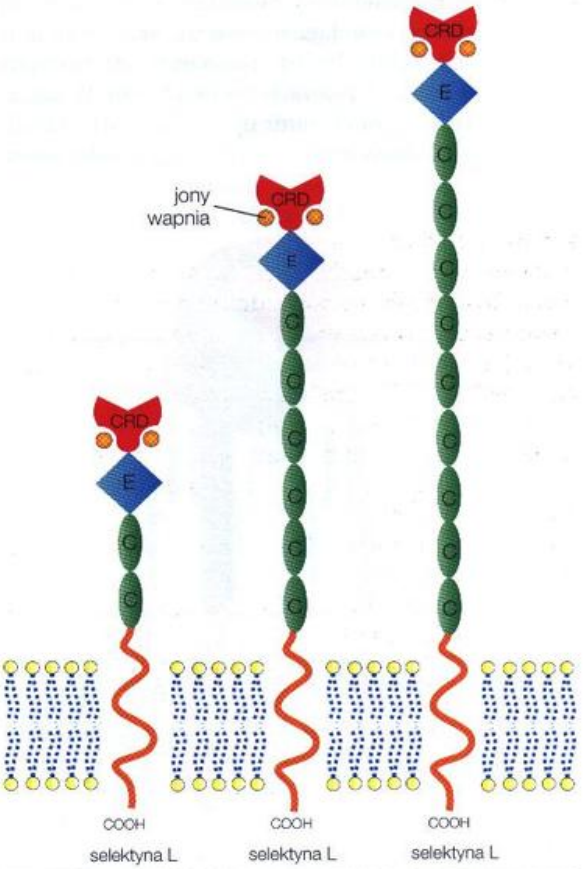
Tabela 11.1 Ogólna charakterystyka ważniejszych białek adhezyjnych

Rodzaj	Nazwa	Ogólne cechy	Ważniejsza funkcja
Selektyny	duże litery pochodzące od typu komórek, np. selektyna E – na śródbłonkach	tworzą słabe, czasowe połączenia międzykomórkowe; wiążą cukry glikoprotein i mucyn innych komórek	rozpoznawanie komórek i pierwszy kontakt z innymi komórkami
Integryny	od rodzaju podjednostek α i β, np.: α1β1, α2β4, αLβ1	wiążą komórki ze składnikami substancji międzykomórkowej, np. lamininą i fibronektyną, tworząc połączenia zwierające z udziałem cytoszkieletu; czasowe połączenia między komórkami	tworzenie połączeń komórek z błoną podstawną – hemidesmosomów i przyczepów ogniskowych; połączenia leukocytów ze śródbłonkiem
Kadheryny	duże litery pochodzące od typu komórek, np. kadheryna E – na nabłonkach lub zwyczajowe, np. desmoplakina	wiązania homofilowe z innymi komórkami tej samej tkanki tworzące połączenia zwierające z udziałem cytoszkieletu, wymagające jonów Ca (stąd nazwa)	tworzenie desmosomów i obwódek zwierających w nabłonkach
Nadrodzina Ig (IgCAM)	pierwsza litera pochodzi od rodzaju komórki, np. NCAM na neuronach, lub skróty od nazw zwyczajowych, np. MAG	tworzą powiązania homo- lub heterofilowe o charakterze trwałym lub czasowym	liczne połączenia międzykomórkowe w układzie nerwowym i komórek immunologicznych

komórkami różnego typu, np. leukocyty–śródbłonek. Obecność selektyn na komórkach śródbłonka wskazuje leukocytom miejsca, do których powinny przejść wybrane leukocyty (zob. dalej). Selektyny są glikoproteinami zbudowanymi z C-końcowej domeny wewnątrzkomórkowej, domeny wewnątrzbłonowej, a na zewnątrz komórki ze zmiennej liczby powtarzających się domen białkowych (każda zbudowana z 62 aminokwasów), tzw. domeny EGF i domeny rozpoznającej cukry (ang. CRD – *carbohydrate-recognition-domain*) (ryc. 11.1). Ta ostatnia domena ma budowę i właściwości podobne do lektyn i wiąże ligandy na powierzchni innych komórek, np. ligand sialyl-Lewis-x. Wiązanie to jest zależne od jonów wapnia. Wyróżnia się wiele rodzajów selektyn, a do najbardziej znanych należą selektyny L, E i P. Bliższa ich charakterystyka podana jest w tabeli 11.2.

Integryny

Integryny są heterodimerycznymi glikoproteinami błonowymi, których główna funkcja polega na tworzeniu trwałych połączeń komórki z cząsteczkami międzykomórkowymi lub czasem między komórkami.. Cząsteczka integryny jest zbudowana z dwóch niekowalencyjnie połączonych różnych glikoproteinowych podjednostek oznaczonych jako α i β (ryc. 11.2). Ligand łączy podjednostka β, podjednostka α wiąże natomiast kationy dwuwartościowe i może wpływać na swoistość rozpoznawania i wiązania ligandu. Najczęstszymi ligandami są liczne cząsteczki między-

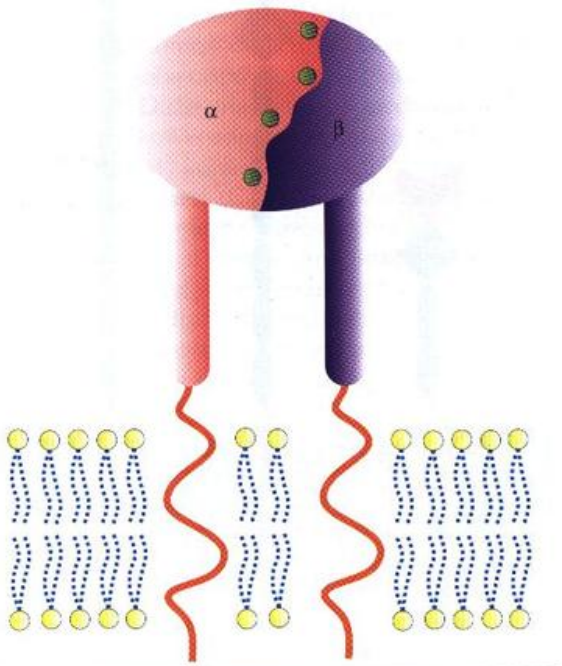


Rycina 11.1 Budowa wybranych selektyn: c – powtarzające się domeny zewnątrzkomórkowe, E – domena podobna do EGF, CRD – domena wiążąca się z grupami cukrowymi glikoprotein błonowych innych komórek.

Tabela 11.2 Ważniejsze typy selektyn

Cząsteczka	Główne występowanie	Ważniejsze ligandy
Selektyna L	leukocyty	CD34, niektóre IgCAM
Selektyna E (ELAM-1)	komórki śródbłonka	sialyl-Lewis-x
Selektyna P	płytki krwi	sialyl-Lewis-x, selektyna P

komórkowe, np. kolagen, laminina, fibronektyna lub cząsteczki IgCAM swoiste dla wielu typów komórek (zob. niżej). Związanie ligandu przez integryny wywołuje w komórce wiele efektów, np. przyłączenie do integryn filamentów cytoszkieletu (włókienek aktynowych) za pomocą białek łączących (α-aktynina, talina, winkulina). W wielu komórkach brak połączenia integryn z ligandami może doprowadzić do apoptozy. Ważną cechą integryn jest także to, że większość z nich wymaga aktywacji koniecznej do połączenia się z ligandem, np. połączenie selektyn z ligandem aktywuje w tej komórce integryny łączące się ze śródbłonkiem (zob. niżej). Dotychczas poznano 18 różnych podjednostek α i 8 różnych podjednostek β, oznaczonych kolejnymi cyframi np. α1, α2 i β1, β2 itd. W poszczególnych integrynach mogą występować różne kombinacje obu podjednostek, obecnie znane są 24 różne heterodimery (tab. 11.3). Integryny odgrywają kluczową rolę w przemieszczaniu się komórek np. podczas embriogenezy, przerzutowania nowotworów oraz podczas ekstrawazacji. W komórkach zachodzi również ekspresja białek ADAM (*a desintegrin and metalloproteaze*), które mogą zapobiegać łączeniu się komórek ze składnikami ECM, co jest bardzo istotne w wielu procesach związanych z ukierunkowaną migracją. Dezintegryny blokują integryny, a metaloproteinazy degradują składniki ECM.



Rycina 11.2 Cząsteczka integryny zbudowana z dwóch podjednostek α i β; zielone kropki oznaczają miejsca wiązania kationów dwuwartościowych.

KLINIKA

O istotnym znaczeniu integryn dla funkcjonowania organizmu przekonują liczne doświadczenia na myszach ze znokautowanymi genami dla integryn. Wykazały one albo wczesną śmiertelność w okresie płodowym, albo znaczne deformacje rozwojowe. Mniejsze nieprawidłowości budowy integryn lub ich uszkodzenie są przyczyną wielu chorób. Jedną z nich jest **pemfigoid**, w którym autoprzeciwciała uniemożliwiają integrynom łączenie się z lamininą, co utrudnia tworzenie się hemidesmosomów w naskórku. Powoduje to tworzenie się pęcherzy, nadżerek skóry i ich zakażenia. Inną chorobą jest **trombastenia Glanzmana**, w której występuje wrodzona mutacja genu dla integryny α2bβ3 (glikoproteiny płytkowej gpIIIa), która jest odpowiedzialna za łączenie się m.in. z fibrynogenem. Nieprawidłowa budowa tej integryny zaburza krzepliwość krwi, wywołując liczne krwawienia.

Kadheryny

Kadheryny są rodziną glikoprotein błonowych, tworzących homofilowe (czyli z inną kadheryną) połączenia międzykomórkowe, szczególnie w tkance nabłonkowej i nerwowej. Kadheryny są tkankowo lub komórkowo swoiste. Cząsteczka kadheryny ma ciężar 120–140 kD i jest zbudowana z domeny wewnątrzkomórkowej, domeny wewnątrzbłonowej i pięciu powtarzających się domen zewnątrzkomórkowych. Te ostatnie tworzą zależne od jonów

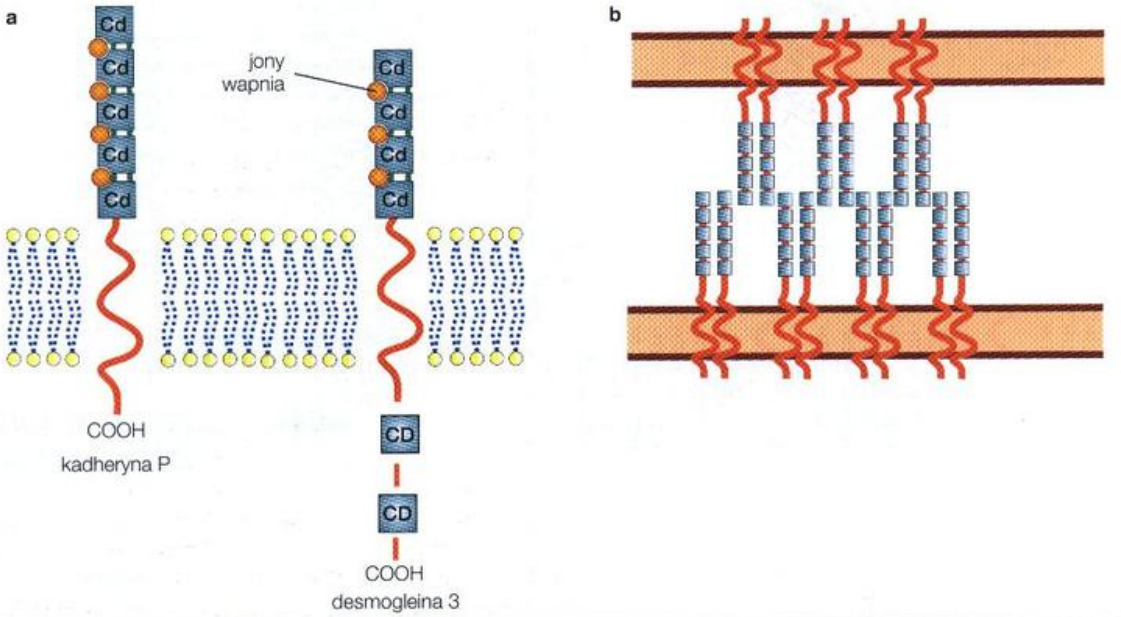
Tabela 11.3 Ważniejsze typy integryn

Cząsteczka	Główne występowanie	Ważniejsze ligandy
α1β1	limfocyty B, NK aktywne T, śródbłonek, lemocyty, fibroblasty	laminina, kolagen, tenascyna
α4β1	limfocyty T, eozynofile, fibroblasty, ependyma	fibronektyna, VCAM-1
αLβ2 (LFA-1α)	leukocyty, limfocyty T, makrofagi	ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3
α2bβ3	płytki krwi	fibronektyna, czynnik von Willebrandta
α6β4	lemocyty	laminina, śródbłonek
αvβ8	oligodendroglej, synapsy mózgowe	fibronektyna

wapniowych połączenia homodimeryczne, tzn. zawsze z kadheryną, która może być tego samego lub innego typu (ryc. 11.3). Połączenia kadheryn sąsiednich komórek tworzą większe kompleksy, widoczne w mikroskopie elektronowym jako połączenia międzykomórkowe typu zwierającego. Domena cytoplazmatyczna łączy się zawsze z kateninami (zob. niżej), a te z różnymi filamentami cytoszkieletu. Z tego względu kadheryny dzieli się na występujące w połączeniu z filamentami aktynowymi lub z filamentami pośrednimi (w desmosomach). Te pierwsze, w zależności od występowania nazywa się kadherynami E, kadherynami N itd., a te drugie desmogleinami lub desmokolinami (tab. 11.4). Budowa desmokolin jest bardzo podobna do budowy typowych kadheryn. Desmogleiny składają się natomiast z czterech domen zewnątrzkomórkowych, a w części cytoplazmatycznej mają 2–6 domen charakterystycznych tylko dla desmoglein.

Nadrodzina immunoglobulin

Jest to duża rodzina cząsteczek adhezyjnych zawierających powtarzające się domeny immunoglobulinowe (ang. IgCAM – *immunoglobulin superfamily cell adhesion molecule*). Znanych jest ponad 70 glikoprotein należących do tej rodziny. Każda z tych cząsteczek jest zbudowana z domeny wewnątrzkomórkowej, domeny wewnątrzbłonowej (obie te domeny czasami mogą się znacznie różnić) i zmiennej swoistej domeny zewnątrzkomórkowej, która składa się z jednej lub wielu pętli zbudowanych z 60–100 aminokwasów (ryc. 11.4). Każda z pętli, podobnie jak w immunoglobulinach, powstaje przez połączenia dwusiarczkowe. IgCAM są stałymi lub długotrwały-



Rycina 11.3 Kadheryny: **a.** kadheryna P i desmogleina 3; **b.** układ cząsteczek kadheryn w połączeniach zwierających; Cd – powtarzające się domeny zewnątrzkomórkowe, CD – domeny cytoplazmatyczne; pomarańczowe kropki oznaczają miejsca wiązania jonów wapnia.

Tabela 14.4 Ważniejsze typy kadheryn (ligandem jest zawsze inna kadheryna)

Cząsteczka	Główne występowanie
Kadheryna E	nabłonki
Kadheryna N	tkanka nerwowa, soczewka oka, mięśnie
Kadheryna BR	mózg
Kadheryna P	łożysko
Kadheryna R	siatkówka oka
Kadheryna M	tkanka mięśniowa
Desmokolina 1	skóra
Desmokolina 2	nabłonki, serce
Desmokolina 3	skóra, śluzówki
Desmogleina 1	naskórek, język
Desmogleina 2	wszędzie
Desmogleina 3	naskórek, język

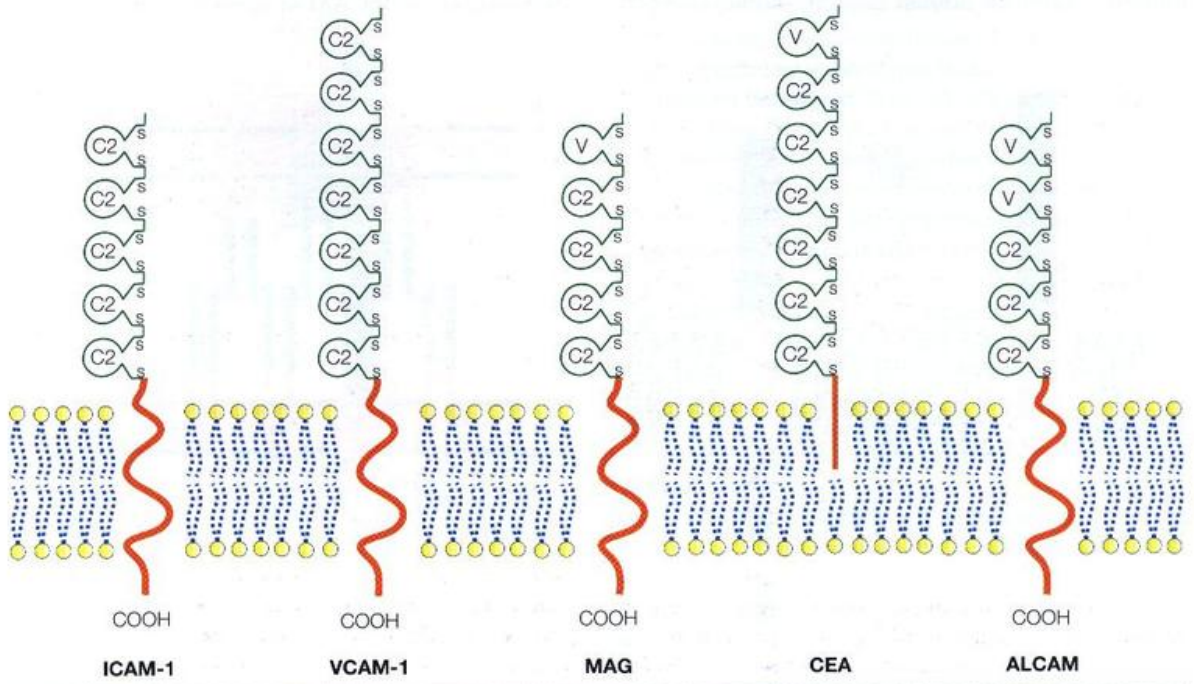
mi składnikami błon wielu komórek i tworzą najczęściej trwałe połączenia homofilowe z identycznymi IgCAM lub heterofilowe z innymi IgCAM. Połączenie to powstaje dzięki bocznym połączeniom domen zewnątrzkomórkowych i jest niezależne od kationów dwuwartościowych. Niektóre IgCAM tworzą też połączenia z integrynami. Najważniejszą funkcją tych cząsteczek jest tworzenie połączeń między komórkami w układzie nerwowym. IgCAM biorą udział np. we wzroście i ukierunkowaniu aksonów, mielinizacji, a także w łączeniu leukocytów i płytek krwi ze śródbłonkami oraz interakcji komórek APC z limfocytami. Ze względu na typ komórek, na których występują, dzieli się je na dwie duże grupy: IgCAM swoiste dla układu nerwowego i IgCAM systemowe (tab. 11.5).

KLINIKA

Do IgCAM należy także CD4, występująca w błonie limfocytów Th. Cząsteczka ta jest receptorem dla **wirusa HIV-1**, co umożliwia wirusom atakowanie i niszczenie limfocytów Th i powoduje stopniowe załamywanie się odporności, aż do wystąpienia często śmiertelnie groźnej choroby **AIDS** (*acquired immune deficiency syndrome*). Ważnym przykładem są także ICAM-1 i ICAM-2, których ekspresja na śródbłonku ułatwia przechodzenie leukocytów do miejsc zapalnych.

Inne cząsteczki adhezyjne

Część ze znanych CAM nie została dostatecznie scharakteryzowana lub nie można ich zaliczyć do żadnej z wymienionych wyżej grup. PGP-1, znane jako CD44, ma silnie rozbudowaną część ze-



Rycina 11.4 Budowa wybranych cząsteczek adhezyjnych z nadrodziny immunoglobulin (IgCAM). Większość IgCAM jest glikoproteinami transbłonowymi, a niektóre (CEA) są połączone bezpośrednio z lipidami błony; V, C2 – powtarzające się domeny podobne do występujących w immunoglobulinach.

Tabela 11.5 Ważniejsze typy cząsteczek nadrodziny immunoglobulin (IgCAM)

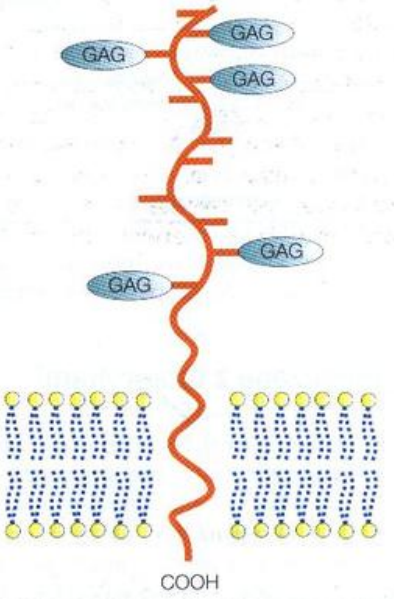
Cząsteczka	Główne występowanie	Ważniejsze ligandy
	IgCAM swoiste dla tkanki nerwowej	
NCAM-1	neurony	NCAM-1
PMP-22	mielina	PMP-22
MAG	mielina	MAG
MOG	oligodendrocyty	MOG
	IgCAM systemowe	
ALCAM	neurony, limfocyty	CD6, NgCAM
BLCAM	limfocyty B	CD45
ICAM-1 i ICAM-2	wiele komórek	$\alpha L\beta 2$
PECAM	leukocyty	$\alpha v\beta 3$, CD31
VCAM-1	monocyty, aktywowane komórki śródbłonka	$\alpha 4\beta 1$, $\alpha 4\beta 7$
CEA	komórki nabłonkowe, granulocyty	połączenia homofilowe z innymi białkami rodziny CEACAM

wnątrzkomórkową, do której dołączone są 4 GAG i domenę łączącą kwas hialuronowy. Glikoproteina ta występuje w błonie limfocytów, monocytów i komórek śródbłonka. W błonach komórek nabłonkowych może też występować kolagen typu XVII, zbudowany z jednego łańcucha, którego C-koniec znajduje się w cytoplazmie. Kolagen ten wraz z integrynami łączącymi lamininę buduje hemidesmosomy. W błonach komórek mięśniowych występuje duża glikoproteina transbłonowa, zwana dystreoglikanem, która wraz z dystrofiną (zob. niżej) pośredniczy w łączeniu filamentów aktynowych i odgrywa istotną rolę w rozwoju mięśni. Okludyna i klaudyna są natomiast przedstawicielami rodzin białkowych budujących połączenia zamykające, a koneksyna tworzy połączenia typu neksus. Mogą one tworzyć między sobą połączenia homo- lub heterofilowe. W błonie wielu komórek występują też proteoglikany, których przykładem jest syndekan zawierający 3-6 GAG (ryc. 11.5). Proteoglikan ten łączy się z wieloma składnikami ECM oraz selektynami i IgCAM.

Porównanie budowy ważniejszych typów CAM i ich połączeń przedstawiono na rycinie 11.6.

Białka wewnątrzkomórkowe związane z CAM

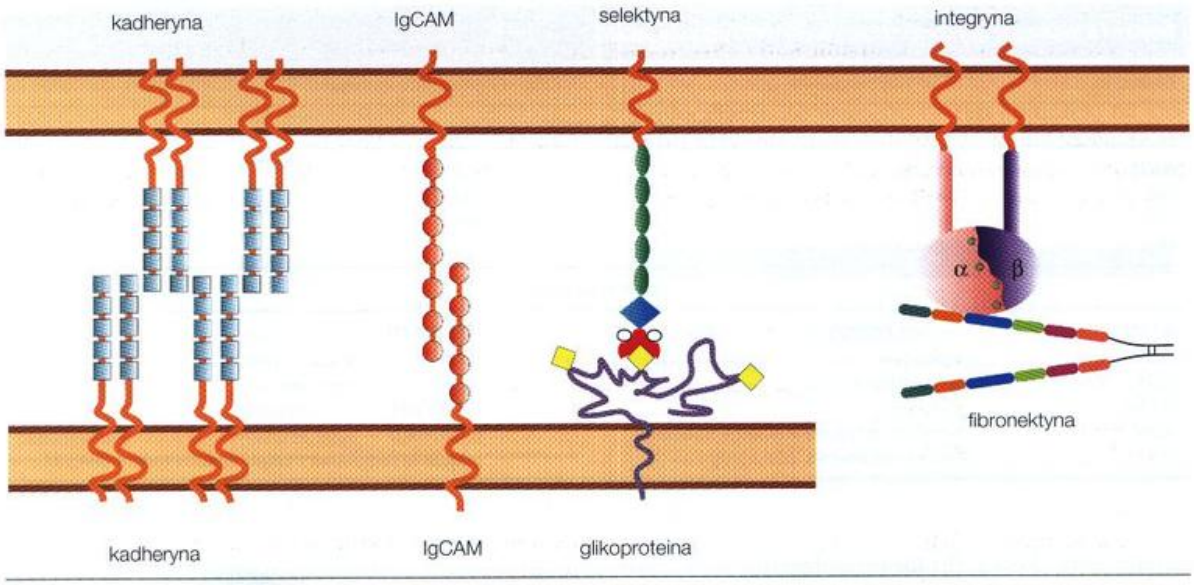
Wiele cząsteczek adhezyjnych wiąże nie tylko inne komórki lub cząsteczki ECM, ale ich domeny wewnątrzplazmatyczne wiązać mogą na trwałe lub przejściowo białka cytoplazmatyczne, co szczególnie dobrze jest widoczne w połączeniach międzykomórkowych typu zwierającego.



Rycina 11.5 Syndekan, cząsteczka CAM o budowie proteoglikanu z licznymi GAG.

Białka połączone z kadherynami

Kateniny są to białka cytoplazmatyczne, które pośredniczą w połączeniu kadheryn z filamentami aktynowymi. Budowa i funkcje są podobne do winkuliny łączącej filamenty aktynowe z integrynami. Znane są trzy podjednostki: katenina α, β i γ. Podjednostka α łączy się z filamentami aktynowymi, a β z cytoplazmatyczną domeną kadheryn. Podjednostka β współdziała ponadto z kinazami tyrozynowymi i receptorem dla EGF i dlatego uważa się, że może odgrywać rolę regulacyjną w tworzeniu



Rycina 11.6 Porównanie budowy podstawowych CAM i ich udziału w adhezji komórek. Kadheryny tworzą połączenia homofilowe z kadherynami innych komórek. IgCAM tworzą najczęściej połączenia homofilowe lub heterofilowe z innymi IgCAM. Ligandem dla selektyn są glikoproteiny powierzchniowe zawierające określone grupy cukrowe (np. sialyl-Lewis-x). Integryny łączą się najczęściej z glikoproteinami ECM: fibronektyną lub lamininą.

połączeń międzykomórkowych, głównie podczas rozwoju. Białkami łączącymi filamenty cytokeratynowe z kadherynami w desmosomach są plaktoglobina (katenina γ), desmoplakiny i plektyna.

Białka połączone z integrynami

Należą tu białka łączące bezpośrednio lub pośrednio domeny cytoplazmatyczne integryn z filamentami cytoszkieletu. Z filamentami aktynowymi związane są **α-aktynina** i winkulina oraz talina, tensyna i paksylina, a w mięśniach ponadto dystrofina. Szczególnie ważna jest **paksylina**, która jest aktywowana w przypadku powstania połączenia cząsteczka międzykomórkowa – integryna – filamenty aktynowe (w przyczepie ogniskowym; zob. niżej), gdyż przez aktywację kinazy tyrozynowej aktywuje Ras. Białko Ras aktywuje dalej kaskadę kinaz aktywujących, np. enzymy wewnątrzkomórkowe lub białka regulatorowe genów. Z filamentami pośrednimi integryny są związane natomiast przez białka z rodziny plakoglobin.

Cząsteczki międzykomórkowe

Substancja międzykomórkowa (ang. ECM – *extracellular matrix*) występuje we wszystkich tkankach, ale najwięcej jest jej w tkance łącznej, w której decyduje o właściwościach i charakterze poszczególnych typów tej tkanki. Składniki ECM są jednak nie tylko elementem budulcowym, ale także mają istotne znaczenie w formowaniu tkanek, lokalizacji i migracji komórek, determinują kształt komórek oraz uczestniczą w przekazywaniu sygnałów wewnątrzkomórkowych. Składniki ECM są wytwarzane przez fibroblasty lub ich odpowiedniki, np. osteoblasty, a w mniejszych ilościach – także przez inne komórki, np. mięśniowe gładkie. Do głównych cząsteczek ECM zalicza się: glikozaminoglikany (GAG) i proteoglikany, glikoproteiny (białka niekolagenowe) oraz białka tworzące włókna tkanki łącznej. O właściwościach ECM decyduje także współdziałanie wielu metaloproteinaz (kolagenazy, stromolizyny) i ich inhibitorów (TIMPs, *tissue inhibitors of metalloproteinases*).

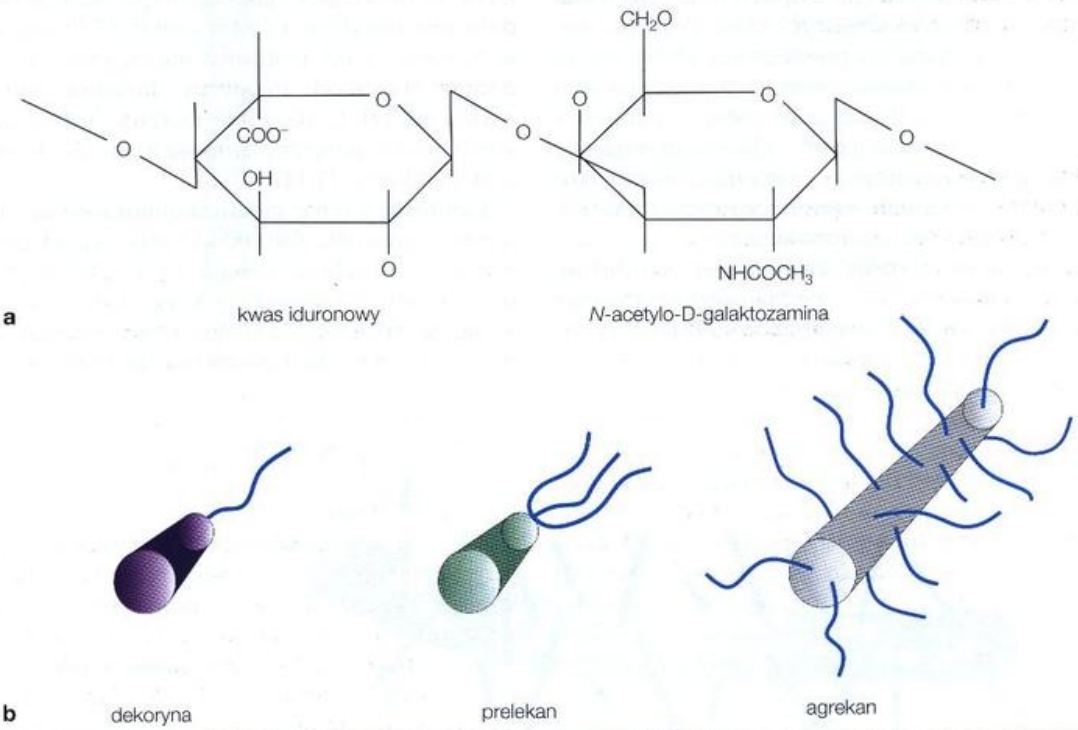
Glikozaminoglikany i proteoglikany

Glikozaminoglikany (GAG) są to duże nierozgałęzione polimery identycznych dwucukrów. Długość tych polimerów wynosi zwykle ok. 100–120 dwucukrów, a w przypadku kwasu hialuronowego wynosić może nawet 12 000 dwucukrów. Każdy z powtarzających się dwucukrów w GAG składa się z **kwasu uronowego i aminoheksozy**. Różne kombinacje obu cząsteczek powodują występowanie wielu rodzajów GAG, swoistych dla tkanek i narządów (tab. 11.6,

ryc. 11.7 a). Do GAG często są dołączone grupy siarczanowe, które razem z grupami karboksylowymi kwasów uronowych nadają tym cząsteczkom polianionowy charakter. Dlatego GAG wiążą kationy, ale są także silnie hydrofilne. Wiązanie dużej ilości wody powoduje pęcznienie GAG i powstanie struktury żelopodobnej. GAG (poza kwasem hialuronowym) są połączone krótkimi rdzeniami białkowymi lub glikoproteinowymi w większe struktury, zwane proteoglikanami (ryc. 11.7 b). Każdy proteoglikan zawiera różne GAG, które stanowią często ponad 90% masy cząsteczek (tab. 11.7). Komórki nie wytwarzają samych GAG, lecz gotowe już proteoglikany. Pierwotnie w siateczce śródplazmatycznej

Tabela 11.6 Ważniejsze GAG, ich budowa i występowanie

GAG	Budowa			Główne występowanie
	masa cząsteczkowa	składnik proteoglikanów	powtarzalny dwucukier (kwas uronowy i aminoheksoza)	
Kwas hialuronowy	do 10^7	–	kwas D-glukuronowy i N-acetylglukozamina	chrząstki, pępowina, tkanki łączne włókniste
Siarczan 4-chondroityny	do 10^7	+	kwas D-glukuronowy i N-acetylgalaktozamina	chrząstki, kości, skóra, aorta
Siarczan 6-chondroityny	do 10^4	+	kwas D-glukuronowy i N-acetylgalaktozamina	chrząstki, skóra
Siarczan dermatanu	do 10^4	+	kwas D-glukuronowy lub D-iduronowy i N-acetylgalaktozamina	skóra, ścięgna
Siarczan heparanu	do 10^7	+	kwas D-glukuronowy lub D-iduronowy i N-acetylglukozamina	płuca, wątroba, błony podstawne
Siarczan keratanu	do 10^4	+	kwas D-galaktoza i N-acetylgalaktozamina	rogówka, jądra miażdżyste
Heparyna	do 10^4	+	kwas D-glukuronowy lub D-iduronowy i N-acetylglukozamina	płuca, wątroba, skóra i w komórkach tucznych



Rycina 11.7 GAG i proteoglikany: **a**. przykładowy dwucukier, składnik siarczanu dermatanu; **b**. GAG (*niebieskie nitki*) połączone rdzeniem białkowym w proteoglikany.

Tabela 11.7 Ważniejsze proteoglikany i ich charakterystyka

Proteoglikan	Liczba łańcuchów GAG i masa cząsteczkowa (kD)	Rodzaj GAG	Występowanie i rola
Agrekan	ok. 130; 210	siarczany chondroityny i keratanu	chrząstka – tworzy duże agregaty w połączeniu z kwasem hialuronowym
Dekoryna	1; 40	siarczany chondroityny lub dermatanu	w większości tkanek łącznych, wiąże kolagen typu I
Perlekan	2–5; 600	siarczan heparanu	błony podstawne – strukturalna i filtracyjna
Serglicina	10–15; 20	siarczany chondroityny lub dermatanu	leukocyty – składnik pęcherzyków wydzielniczych
Syndekan	3–6; 35–120	siarczany chondroityny lub heparanu	cząsteczka adhezyjna w błonie fibroblastów i komórek nabłonka

szorstkiej powstaje rdzeń białkowy z dużą liczbą seryn, do których w aparacie Golgiego transferaza glikozylowa przyłącza kolejno dwucukry wiązaniem O-glikozylowym.

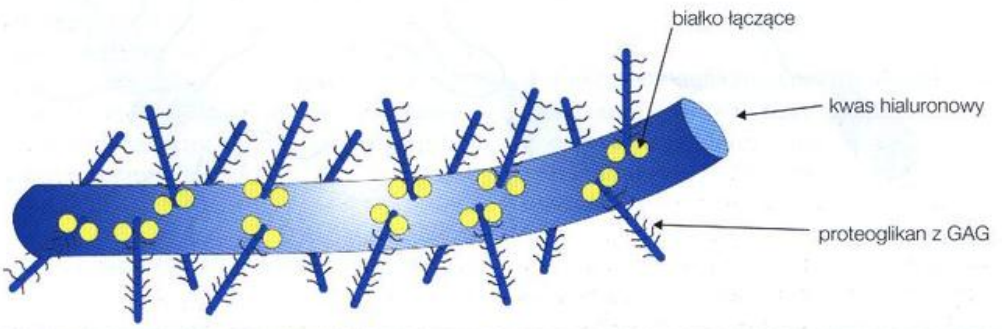
Glikozaminoglikanem o nieco odmiennych właściwościach jest **kwas hialuronowy**, który jest największym GAG; zbudowany jest z ok. 12 000 dwuheksos (kwas D-glukuronowy i N-acytylglukozamina). Nie zawiera grup siarczanowych i nie tworzy proteoglikanów, ale może łączyć proteoglikany w większe kompleksy. W wielu tkankach występują specjalne białka wiążące proteoglikany z kwasem hialuronowym, co powoduje powstanie olbrzymich kompleksów (ryc. 11.8). Ponadto niektóre komórki mają na powierzchni błony białka wiążące ten kwas. Występuje w wielu typach tkanki łącznej, głównie w tkance włóknistej luźnej. Duże kompleksy tego kwasu z proteoglikanami stanowią filtr dla makrocząsteczek, ograniczają migrację komórek, m.in. komórek nowotworowych i bakterii niewytwarzających hialuronidazy.

Szczególnym proteoglikanem jest **syndekan**, który jest zakotwiczony w plazmolemie głównie fibroblastów skóry i wiąże np. fibronektyny.

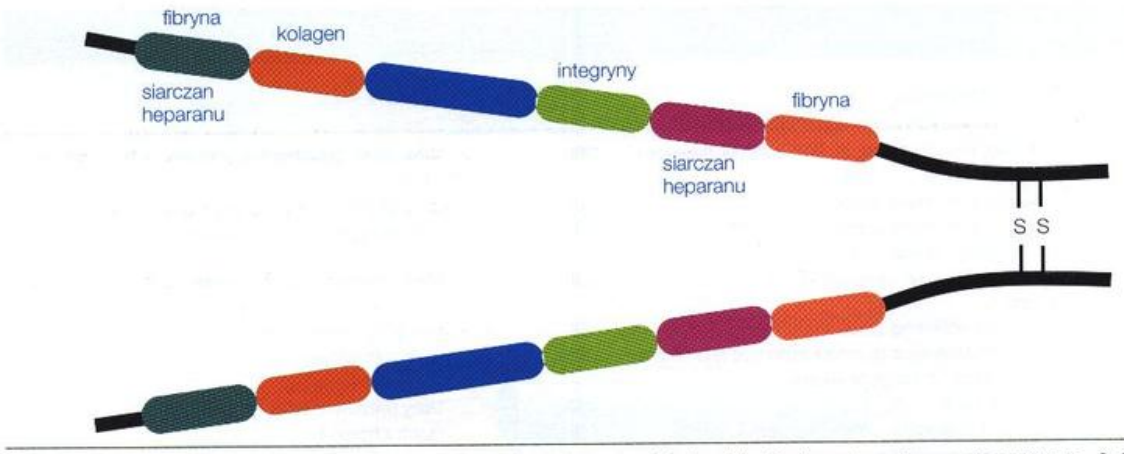
Glikoproteiny ECM – białka niekolagenowe

Fibronektyny są glikoproteinami ECM. Gen fibronektyny jest dużym genem zawierającym 50 egzonów. Alternatywne składanie mRNA prowadzi do powstania różnych mRNA i ponad 20 izoform fibronektyny o masie cząsteczkowej 20 000–250 000 kD. Każda cząsteczka jest homodimerem, tworzące go monomery są połączone na końcach karboksylowych za pomocą mostków dwusiarczkowych (ryc. 11.9). Niektóre izoformy fibronektyny, produkowane głównie w wątrobie, występują w płynach ustrojowych. Większość natomiast jest produkowana przez fibroblasty i jako nierozpuszczalna tworzy delikatne fibryle w ECM. Cząsteczki fibronektyny w zależności od izoformy mogą zawierać wiele domen wiążących integryny, kolagen, heparynę i wiele innych GAG. Fibronektyna może więc pośredniczyć w przyczepianiu się komórek do cząsteczek ECM (ryc. 11.14).

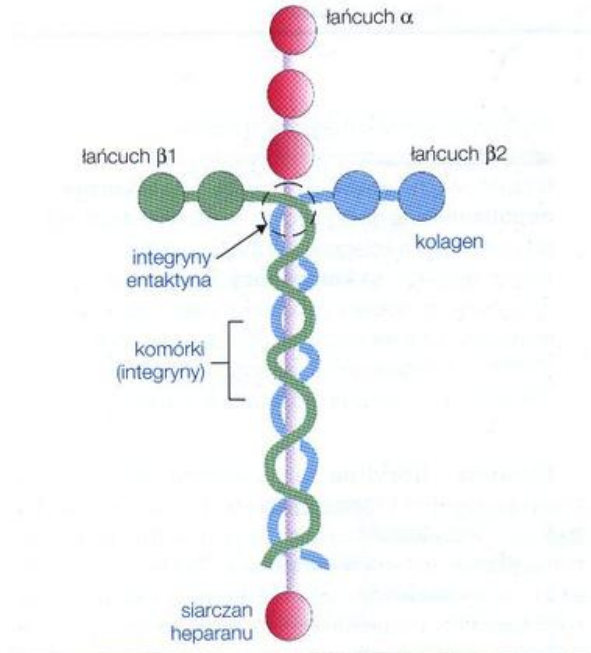
Laminina jest bardzo dużą glikoproteiną o masie cząsteczkowej ok. 850 000 kD zbudowaną z trzech różnych łańcuchów, oznaczonych jako α, $\beta 1$ i $\beta 2$ (ryc. 11.10). Na jednym z końców trzy łańcuchy są razem splecione, a wolne końce formują układ w kształcie krzyża. Cząsteczka lamininy ma wiele



Rycina 11.8 Kwas hialuronowy łączy proteoglikany w większe agregaty.



Rycina 11.9 Cząsteczka fibronektyny zbudowana jest z dwóch identycznych łańcuchów białkowych połączonych mostkami – S–S–. Niebieskim kolorem opisano domeny łączące komórki i składniki ECM.



Rycina 11.10 Cząsteczka lamininy zbudowana jest z trzech łańcuchów białkowych, jednego α i dwóch β. Niebieskim kolorem opisano domeny łączące komórki i składniki ECM.

domen, w tym do wiązania integryn, kolagenu typu IV, entaktyny i proteoglikanów. Szczególnie dużo lamininy występuje w błonach podstawnych. Podstawowa rola lamininy polega na umożliwieniu przyczepiania się komórek do błon postawnych.

Entaktyna (nidogen) jest glikoproteiną występującą głównie w błonach podstawnych i zawierającą domeny do wiązania kolagenu IV i lamininy (ryc. 11.14). **Tenascyna** jest natomiast silnie rozgałęzioną glikoproteiną, łączącą głównie fibronektynę.

Białka pozakomórkowe tworzące włókna

Kolagen jest białkiem występującym u człowieka w największych ilościach. Jest wytwarzany przez fibroblasty i ich odpowiedniki w wielu tkankach. W kolagenie najwięcej jest alaniny, a aminokwasami charakterystycznymi są hydroksyprolina i hydroksylizyna. Oznaczanie tych aminokwasów w moczu daje pośredni wgląd w metabolizm kolagenu. Kolagen jest zbudowany z trzech łańcuchów α-helikalnych skręconych w superhelisę, co wytwarza pałeczkowatą cząsteczkę, zwaną tropokolagenem. Znanych jest ponad 20 podobnych łańcuchów występujących w różnych połączeniach w superhelisie. W różnych tkankach są tworzone różne swoiste łańcuchy α, co prowadzi do powstania ok. 20 różnych typów kolagenów (tab. 11.8). Cząsteczki kolagenu, w zależności od typu, mogą tworzyć grube włókna i pęczki, delikatne włókienka lub sieci (ryc. 11.11 i 11.12). Typ I (występujący najczęściej) tworzy grube włókna lub pęczki, m.in. w kościach, skórze, ścięgnach i torebkach narządów. Typ II i III tworzy układy drobnych włókienek. Częściej występuje typ III, m.in. w tętnicach, nerwach, wątrobie i śledzionie. Cechą charakterystyczną włókien kolagenowych typu III jest zdolność do wychwytywania i redukcji soli srebra, i dlatego w histologii są one opisywane jako **włókna srebrochłonne (retikulinowe)**. Typ IV nie tworzy włókienek, lecz sieci formujące blaszki, które występują głównie w błonach podstawnych. Typy VI, IX i XII także nie tworzą włókienek, lecz umożliwiają łączenie się włókienek innych typów w grube włókna, a także łączą składniki ECM lub integryny komórek. Dlatego te ostatnie typy nazywa się kolagenami towarzyszącymi włóknom (ryc. 11.12 a).

Tabela 11.8 Ważniejsze typy kolagenu

Typ kolagenu	Cechy charakterystyczne	Długość cząsteczki (mm)	Występowanie
I	tworzy grube włókna i pęczki, ok. 90% całej puli kolagenowej organizmu	300	skóra, kości, zęby, ścięgna, więzadła, powięzie, rogówka
II	tworzy włókna lub drobne pęczki	300	chrząstki, dyski międzykręgowe, ciało szkliste oka
III	tworzy włókna lub drobne pęczki nazywane włóknami retikulinowymi lub srebrochłonnym	300	skóra, ścięgna, naczynia krwionośne, macica
IV	cząsteczki kolagenu nie tworzą włókien, lecz układ regularnej sieci	390	błony podstawne, ciałko nerkowe, torebka soczewki oka
V	tworzy cienkie włókienka	300	blaszki podstawne mięśni
VI	cząsteczki umożliwiające łączenie komórek ze składnikami ECM oraz łączy typ I w grube włókna	105	większość tkanek
VII	podobnie jak typ IV	450	błony podstawne skóry i jamy ustnej
IX	cząsteczki na powierzchni włókien kolagenu II, łączące włókna i składniki ECM	200	razem z typem II
XII	cząsteczki na powierzchni włókien kolagenu I, łączące włókna i składniki ECM	?	razem z typem I
XIII i XVII	transbłonowe cząsteczki zbudowane tylko z 1 łańcucha	?	XIII – przyczepy ogniskowe XVII – hemidesmosomy

Kolagen jest syntetyzowany w formie łańcuchów α. Lizyny i proliny tych łańcuchów ulegają hydroksylacji. Kofaktorem hydroksylaz w tym procesie jest witamina C. Do części grup hydroksylowych zostają dołączone grupy cukrowe. Następnie łańcuchy łączą się trójkami za pomocą mostków dwusiarczkowych, wytwarzając **prokolagen**, superhelisę z rozkręconymi na końcach **telopeptydami**. Z wydzielonych poza komórkę cząsteczek prokolagenu telopeptydazy odcinają te końce i powstają cząsteczki kolagenu (**tropokolagen**), które mogą teraz agregować, w zależności od typu kolagenu, w większe struktury, np. włókienka i włókna lub sieci (ryc. 11.11, 11.12). W procesie tym cząsteczki kolagenu typu I łączą się koniec do końca i bok do boku, tworząc włókienka kolagenowe. Regularne ułożenie cząsteczek kolagenu sprawia, że włókienka i włókna kolagenowe są poprzecznie prążkowane. Pozostałe wolne grupy hydroksylowe proliny i lizyny zamieniane są przez oksydazy (kofaktorem jest miedź) do grup aldehydowych, które łączą się ze sobą, wytwarzając wiązania aldolowe stabilizujące całe włókienko. W następnym etapie kolageny towarzyszące włóknom (np. kolagen typu XII) łączą włókienka we włókna, a czasem dalej w grube pęczki.

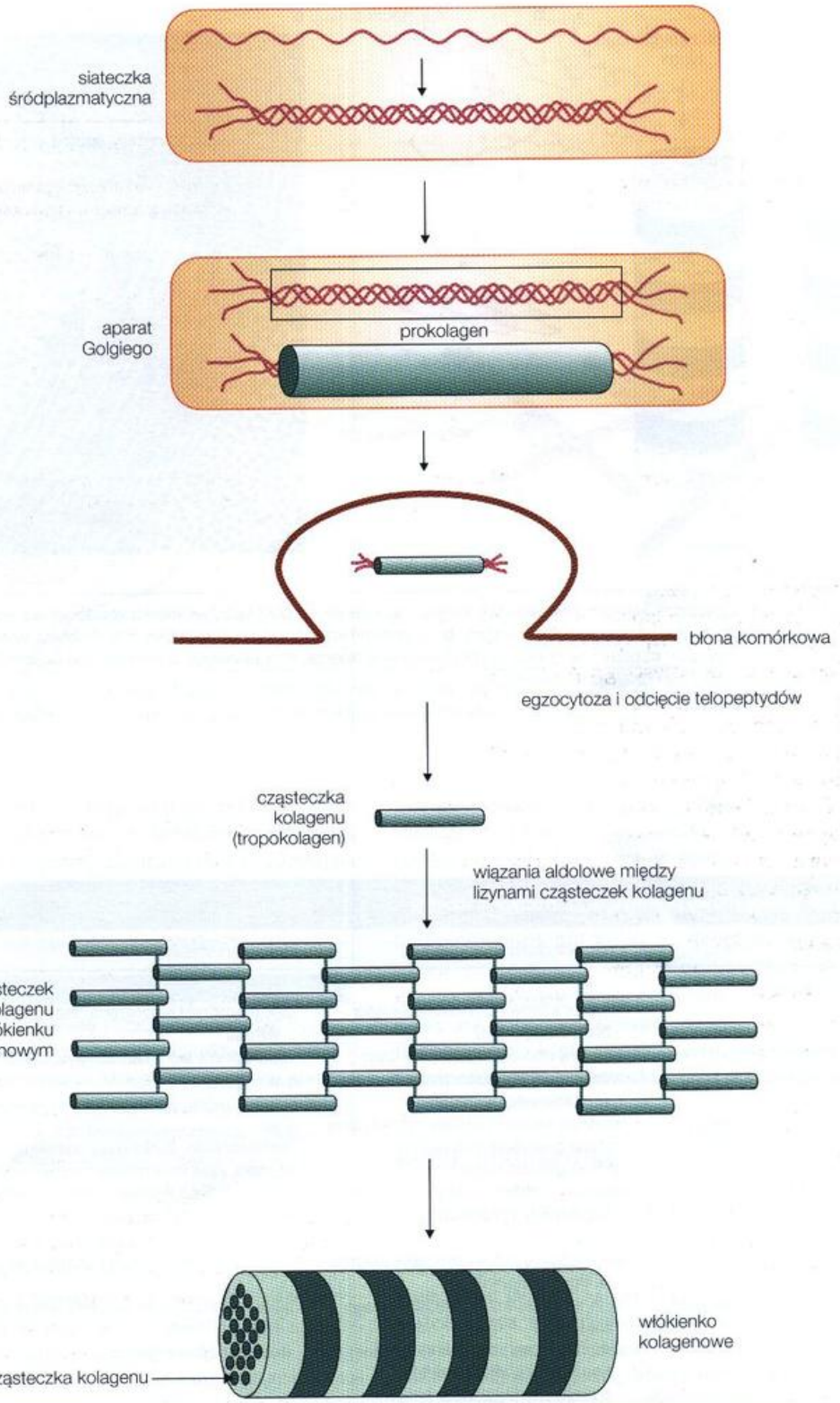
KLINIKA

Synteza kolagenu i tworzenie włókien są procesami wieloetapowymi zależnymi od budowy łańcuchów α oraz wielu enzymów i cząsteczek pomocniczych.

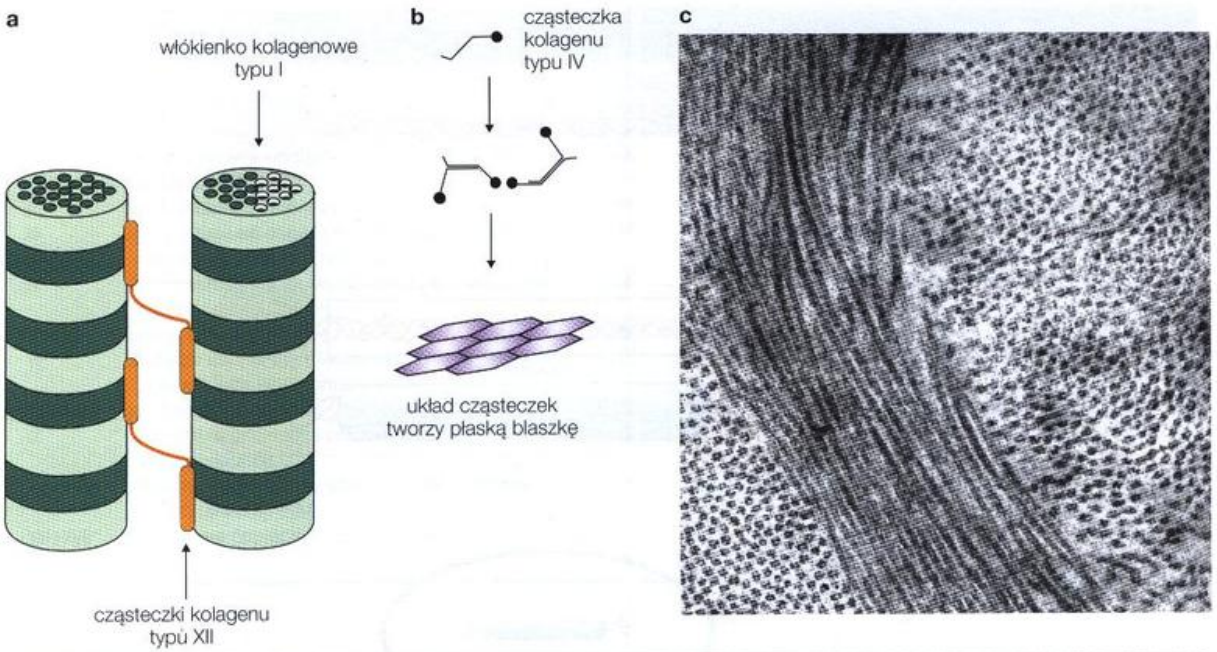
Nieprawidłowości każdej z tych cząsteczek prowadzą do powstania nieprawidłowych włókien kolagenowych, wywołując choroby zwane **kolagenopatiami**. Inną grupą chorób, w których dochodzi do uszkodzenia kolagenu lub innych składników tkanek łącznych, są **kolagenozy**. Kolagenopatie są najczęściej chorobami wrodzonymi lub z niedoboru kofaktorów, a kolagenozy są chorobami o podłożu autoimmunologicznym. Przykłady tych chorób i ich pierwotne przyczyny przedstawiono w tabeli 11.9.

Elastyna i **fibrylina** są głównymi białkami dojrzałych włókien i błon sprężystych, które są bardzo rozciągliwe, ale powracają do poprzednich wymiarów, gdy ustąpi siła rozciągająca. Takie właściwości są szczególnie istotne dla tętnic, płuc i skóry, i dlatego tam występuje najwięcej włókien sprężystych.

Cząsteczki elastyny tworzą homogenny rdzeń włókna, a obwodowo biegną **mikrowłókienka** (mikrofibryle) o średnicy 10–12 nm (ryc. 11.13 a i b), których głównym składnikiem jest fibrylina, glikoproteid bogaty w galaktocukry. Cząsteczka **elastyny** (zwana tropoelastyną), syntetyzowana w fibroblastach i miocytach ściany tętnic, tworzy kompleks z białkiem EBP (ang. *elastin bindingprotein*). EBP może ponadto wiązać galaktocukry, m.in. w fibrylinie i w siarczanie dermatanu. Przyłączenie galaktocukru do EBP powoduje dysocjację kompleksu EBP-tropoelastyna i uwalnia tropoelastynę osadzającą się na MAGP (ang. *microfibrils associated glycoprotein*), składniku mikrowłókienek (ryc.



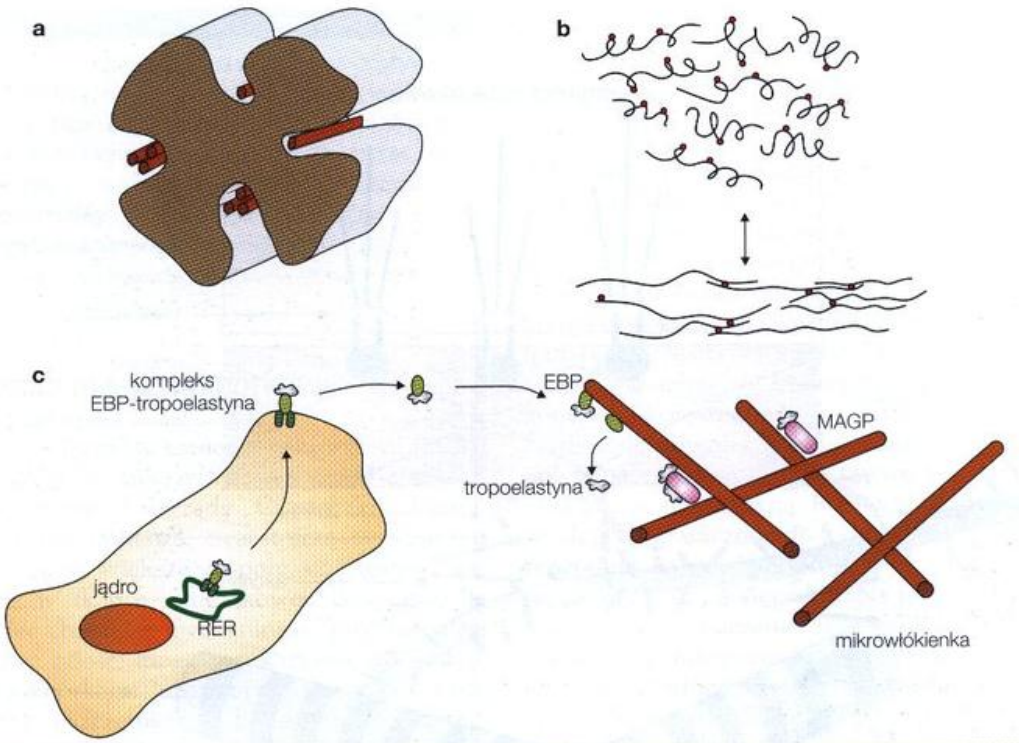
Rycina 11.11 Uproszczony schemat syntezy kolagenu i tworzenia włókienek kolagenowych.



Rycina 11.12 Niektóre cząsteczki kolagenu nietworzące włókien: **a.** kolagen typu XII łączy włókienka zbudowane z kolagenu typu I w większe układy, zwane włóknami kolagenowymi; **b.** cząsteczki kolagenu typu IV łączą się bok do boku, wytwarzając sieć typową dla błon podstawnych; **c.** przekroje podłużne i poprzeczne włókienek kolagenowych w mikroskopie elektronowym. Elektrogram dzięki uprzejmości prof. B. Brelińskiej i dr A. Malińskiej.

Tabela 11.9 Wybrane choroby przebiegające z uszkodzeniem kolagenu

Nazwa choroby	Przyczyna choroby	Ważniejsze objawy
Kolagenopatie		
Szkorbut	niedobór witaminy C powoduje niedobór hydroksylazy proliny	pękanie naczyń i owrzodzenia, słabe gojenie ran, zahamowanie wzrostu
Zespół Ehlersa-Danlosa VI	wrodzony niedobór hydroksylazy lizyny	łatwe pękanie skóry, nadmierna ruchomość w stawach
Zespół Ehlersa-Danlosa I i VII	wrodzony niedobór telopeptydaz (N-peptydazy prokolagenu)	j. w.
Zespół Ehlersa-Danlosa V	wrodzony niedobór oksydazy hydroksylizyny	j. w.
Osteogenesis imperfecta	mutacja genu kolagenu typu I	łamliwość kości, cienka skóra, nadmierna ruchomość w stawach
Zespół Alporta	mutacja genu dla kolagenu typu IV	głuchota, zaburzenia rozwoju oczu, niewydolność nerek
Zespół Menkesa	wrodzony niedobór miedzi powoduje niedobór oksydazy hydroksylizyny	deformacje kości, tętniaki, nadmierna rozciągliwość skóry
Kolagenozy		
Sklerodermia	m. in. autoprzeciwciała przeciwko kolagenowi typu IV i lamininie	rozrost tkanki łącznej skóry i narządów wewnętrznych
Reumatoidalne zapalenie stawów	m. in. autoprzeciwciała przeciwko kolagenowi typu II	gorączka, bóle stawów, zapalenia naczyń, uszkodzenie chrząstek i kości
Zespół Goodpasture'a	autoprzeciwciała przeciwko kolagenowi typu IV i innym składnikom błon podstawnych kłębuszków nerkowych i pęcherzyków płucnych	zespół nerczycowy i niewydolność nerek oraz krwotoki z płuc



Rycina 11.13 Włókno elastyczne: **a**. układ mikrofibryl (mikrowłókienek) w rdzeniu zbudowanym z elastyny; **b**. ułożenie cząsteczek elastyny w stanie podstawowym oraz podczas rozciągania; **c**. mechanizm tworzenia włókien elastycznych (objaśnienia skrótów i szczegóły w tekście).

1.13 c). Reszty lizylowe tropoelastyn tworzą z resztami galaktozy fibryliny z udziałem oksydazy lizylowej trwałe wiązania desmozynowe składające się z 3 albo 4 lizyn. Tak powstała elastyna (polimer tropoelastyny) tworzy wraz z fibryliną (mikrowłókienka) bardzo trwałe włókna sprężyste.

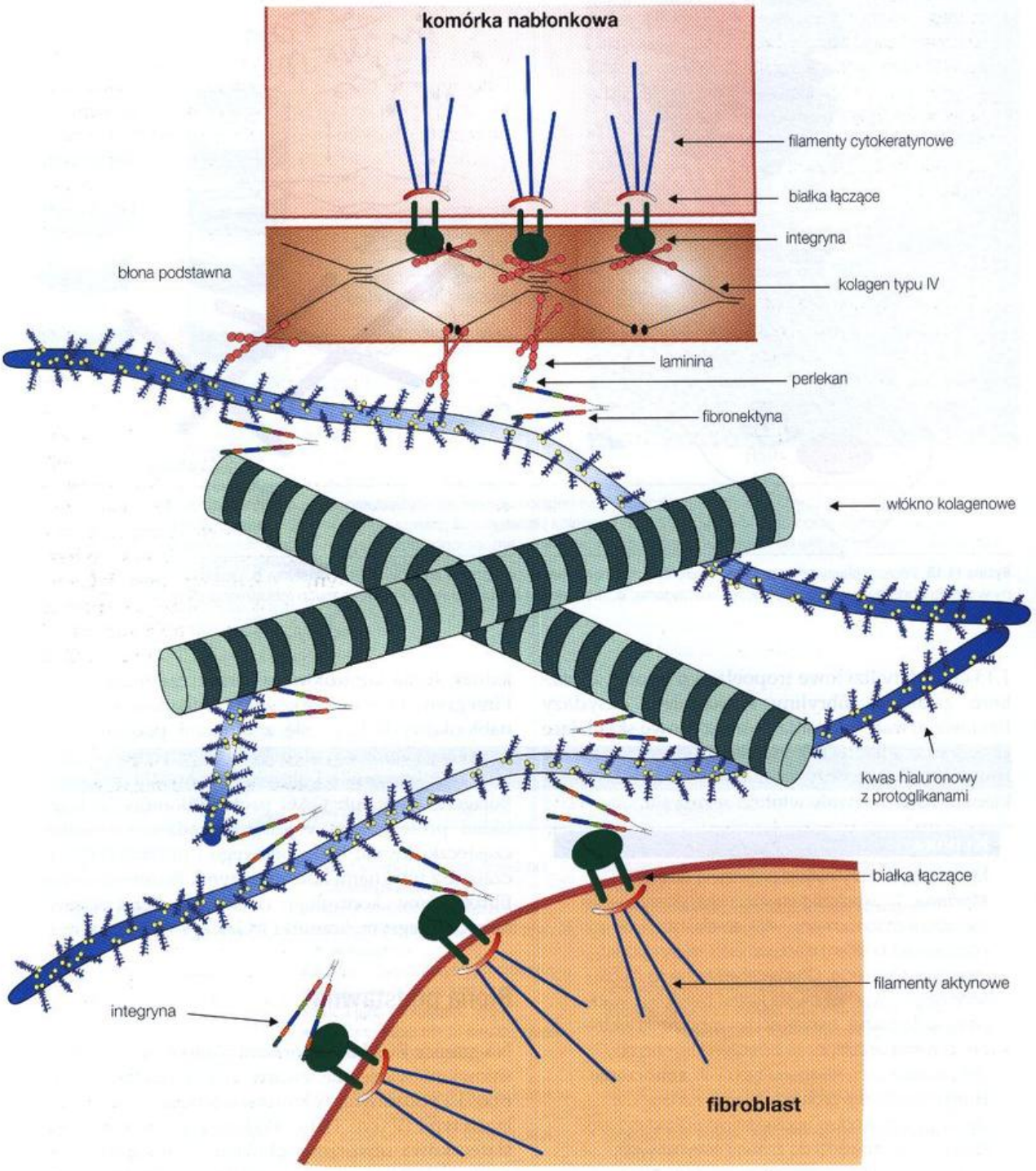
KLINIKA

Mutacja genu fibryliny jest przyczyną **choroby Marfana**. Ta wrodzona choroba charakteryzuje się zaburzeniem formowania włókien elastycznych aorty i objawia się brakiem elastyczności skóry i podatnością na pęknięcia. Charakterystyczne są długie kończyny i palce, lejkowata klatka piersiowa, wady zastawki mitralnej, tętniak aorty i zaburzenia widzenia. Dawniej uważano, że przyczyną tej choroby jest mutacja genu kolagenu typu I. W **schorzeniu Hurler** nadmierne gromadzenie się siarczanów dermatanu powoduje upośledzenie odkładania się elastyny, co prowadzi do zmian naczyniowych.

Ogólną organizację ECM oraz jej połączenia z komórkami przedstawiono na rycinie 11.14. Pozornie bezładny układ poszczególnych elementów jest jednak ściśle kontrolowany przez cząsteczki ECM i integryny błon komórkowych. Integryny komórek nabłonkowych łączą się z błonami podstawnymi za pomocą lamininy, która bezpośrednio lub pośrednio łączy komórki z kolagenem typu IV, włóknami kolagenowymi lub GAG **proteoglikanów**. Z kolei układ proteoglikanów jest uporządkowany przez cząsteczki kwasu hialuronowego i fibronektyny łączące je z włóknami kolagenowymi. Rozmieszczenie fibroblastów kontrolują cząsteczki fibronektyny, łączące integryny komórki z GAG proteoglikanów.

Błona podstawna

Na granicy ECM z komórkami nabłonkowymi i mieśniowymi występuje zwarty cienki pokład zwany **blaszką podstawną**, w której występują laminina i kolagen typu IV (ryc. 11.14). Pod nią występuje **blaszka siateczkowa** utworzona głównie z włókienek kolagenowych typu III (czyli włókien retikulinowych) Obie te blaszki tworzą **błonę podstawną**, która jest dobrze widoczna w mikroskopie elektronowym i swietlnycm po wybarwieniu metodą PAS.



Rycina 11.14 Wzajemne połączenia cząsteczek ECM i cząsteczek adhezyjnych komórki nabłonkowej i fibroblastu.

KLINIKA

W niektórych miejscach błona podstawna odgrywa szczególną rolę, np. w ciałkach nerkowych, gdzie wchodzi w skład **bariery krew-mocz**. W mięśniach szkieletowych błona ta stabilizuje włókna, łącząc się z dystrofiną, białkiem błony komórkowej. Mutacja **genu dystrofiny** (*dystrofia mięśniowa Duchenne'a*) powoduje uszkodzenie sarkolemmy i błony podstawnej, co prowadzi do zaniku włókien, czyli dystrofii.

Połączenia międzykomórkowe

Cząsteczki adhezyjne i międzykomórkowe (ECM) współdziałają w tworzeniu większych struktur, jakimi są tkanki i narządy. Cząsteczki adhezyjne sąsiednich komórek uczestniczą w łączeniu się komórek w większe zespoły, co najlepiej jest widoczne w tkance nabłonkowej. Połączenia te mogą mieć charakter mechaniczny, gdy zespalają komórki w całość; mogą przekazywać informacje między komórkami lub tworzyć miejscami ścisłe zespolenia uszczelniające przestrzenie międzykomórkowe. Ponadto cząsteczki adhezyjne mogą łączyć się z cząsteczkami ECM, umożliwiając komórkom przytwierdzenie do trwałych struktur międzykomórkowych, np. do błon podstawnych lub włókien kolagenowych. Cząsteczki adhezyjne i cząsteczki ECM dodatkowo współdziałają w migracji komórek, umożliwiając ukierunkowany wzrost wypustek komórkowych, np. aksonów, lub przemieszczanie się komórek podczas rozwoju. Pamiętać także należy, że cząsteczki adhezyjne są połączone z białkami cytoszkieletu i mogą aktywować niektóre procesy komórkowe, wewnętrzną organizację komórek i układ komórek w tkance.

Część połączeń między komórkami lub z cząsteczkami ECM tworzą pojedyncze cząsteczki, a część jest utworzona przez duże ich zespoły. Te ostatnie są widoczne w mikroskopie elektronowym i mają najczęściej charakter połączeń trwałych, zwanych połączeniami międzykomórkowymi. Ze względu na ich budowę i funkcję dzieli się je na połączenia zamykające, połączenia zwierające i połączenia jonowo-metaboliczne.

Połączenia zamykające

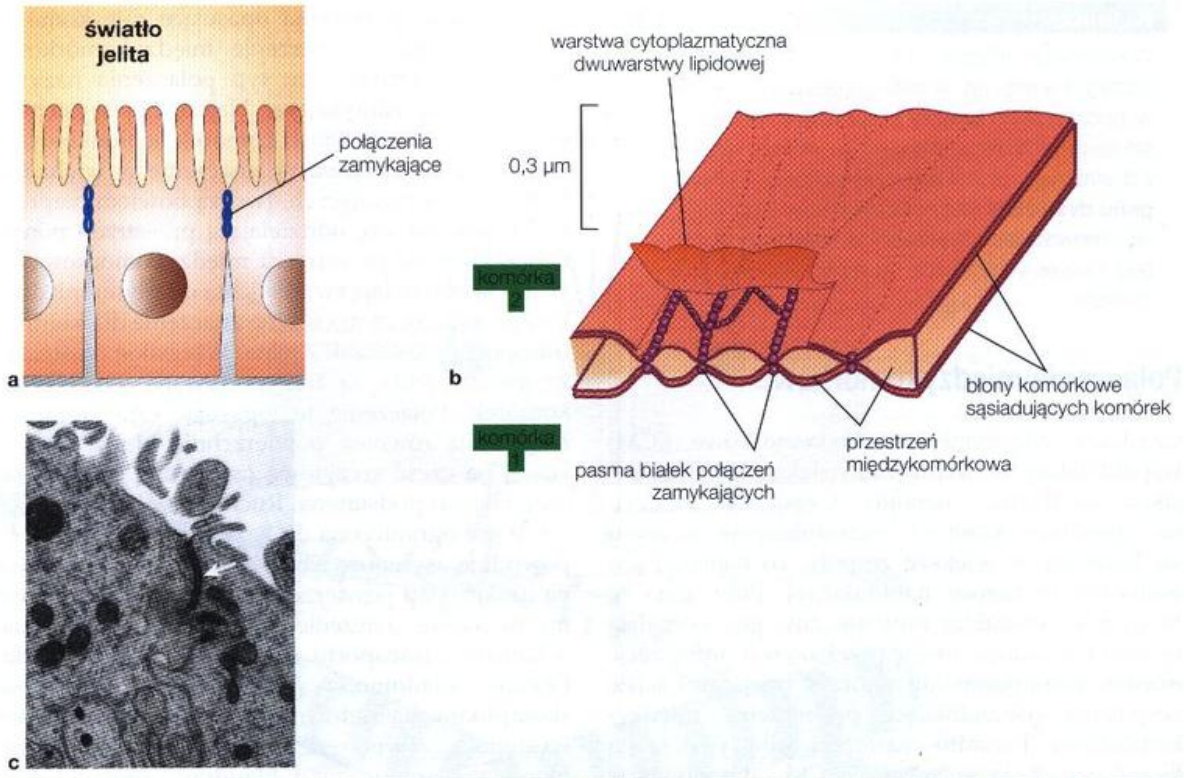
Połączenia zamykające są utworzone przez białka błonowe sąsiednich komórek. Liniowe układy białek błonowych tworzą rozgałęziające się systemy, które łączą się bezpośrednio z identycznymi układami w komórce sąsiedniej. Dzięki temu powstają trwałe połączenia opasujące całe komórki i uszczelniające przestrzenie międzykomórkowe (ryc. 11.15). Dlatego ten typ połączenia nazywa się obwódką zamykającą. Najczęściej występują w szczytowych częściach komórek nabłonkowych. Połączenia te mają ważne znaczenie w wielu nabłonkach pokrywających, tworzą bowiem nieprzepuszczalną barierę oddzielającą przestrzeń ponad nabłonkiem od przestrzeni międzykomórkowych. W jelicie oddzielają światło jelita od płynu międzykomórkowego, co ma ważne znaczenie dla kontroli transportu cząsteczek z jelita. Wszystkie cząsteczki ze światła jelita są transportowane z udziałem komórek. Połączenia te, opasując całą komórkę, rozdzielają również powierzchnię błony komórkowej na część szczytową (zwróconą do światła) oraz boczno-podstawną. Ruchomość białek błonowych jest ograniczona do każdej z części błony, co powoduje asymetrię ich rozmieszczenia i wpływa na funkcję obu powierzchni. Na przykład w jelicie ma to ważne znaczenie czynnościowe i decyduje o kierunku transportu cząsteczek przez komórki. Obecnie wiadomo, że połączenia te mają dość skomplikowaną budowę. Na powierzchni komórek występują zewnętrzne domeny białek przezbłonowych: okludyny i klaudyny, oraz IgCAM: nektyny i JAM. Białka te uszczelniają przestrzenie międzykomórkowe. Od strony cytoplazmatycznej dołączają się białka afadyna, ZO-1, ZO-2 i ZO-3, a do nich włókienka aktynowe.

KLINIKA

Mutacja genu nektyny jest odpowiedzialna za **rozszczepy podniebienia** i wargi oraz dysplazję ektodermalną.

Połączenia zwierające

Połączenia zwierające łączą komórki między sobą lub z ECM, np. z błoną podstawną. Mimo że wyróżnia się wiele typów tych połączeń, to wspólną ich cechą jest połączenie z cytoszkieletem, co powoduje przenoszenie naprężeń na wytrzymałe filamenty, a nie na słabą błonę komórkową (zob. rozdz. 7). Najbardziej typowe połączenia tego typu występują w zespołach komórek, które muszą charakteryzować się dużą wytrzymałością na rozciąganie, np. naskórek i mięsień sercowy. Ze względu na różnice w budowie, umiejscowienie i rodzaj filamentów cytoszkieletu, połączenia te dzieli się na: obwódki lub pasma zwierające, desmosomy, hemidesmosomy (półdesmosomy) i przyczepy ogniskowe (tab. 11.10, ryc. 11.16).



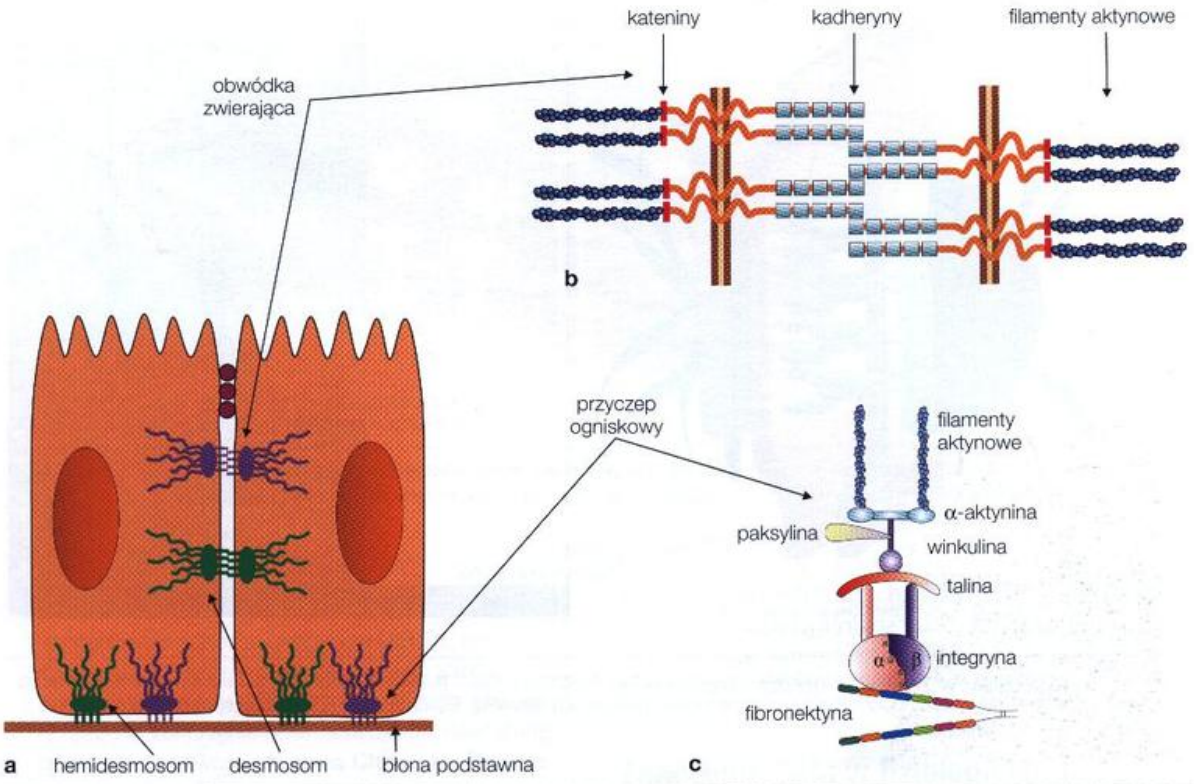
Rycina 11.15 Połączenia zamykające: **a**. schemat pokazujący najczęstsze umiejscowienie tego połączenia, które uszczelniając przestrzenie międzykomórkowe, uniemożliwiają przechodzenie cząsteczek; **b**. schemat molekularny pokazujący budowę połączenia; wiele pasm białek błonowych (okludyna i klaudyna) sąsiednich komórek łączy się, tworząc uszczelnienie (wg B. Alberts i wsp.); **c.** połączenie zamykające w mikroskopie elektronowym widoczne jako ciemne pasmo w części szczytowej sąsiednich komórek nabłonkowych. Elektronogram dzięki uprzejmości prof. B. Brelińskiej i dr A. Malińskiej.

Tabela 11.10 Ważniejsze rodzaje połączeń zwierających i ich charakterystyka

Typ połączenia	Łączone elementy	Białka transbłonowe	Filamenty cytoszkieletu	Wewnątrzkomórkowe białka łączące
Obwódka zwierająca	komórka–komórka	kadheryny	filamenty aktynowe	kateniny (α, β i γ), α-aktynina, desmoplakiny
Przyczep ogniskowy	komórka–ECM	integryny łączące fibronektynę	filamenty aktynowe	
Desmosom	komórka–komórka	desmogleiny i desmokoliny (należące do kadheryn)	filamenty pośrednie	winkulina, talina, α-aktynina, plakoglobiny, desmoplakiny, plektyna, plakofilina i γ-katenina
Hemidesmosom	komórka–ECM	integryny łączące lamininę, kolagen typu XVII	filamenty pośrednie	białka z rodziny desmoglobin

Obwódki zwierające występują najczęściej w komórkach poniżej obwódek zamykających między komórkami nabłonka. W połączeniach tych domeny pozakomórkowe **kadheryn** (desmogleiny i desmokoliny) sąsiednich komórek łączą się ze sobą z udziałem jonów wapnia. Natomiast domeny cytoplazmatyczne łączą się z filamentami aktynowymi tworzącymi siateczkę graniczną. W połączeniu tym pośredniczą m. in. kateniny i α-aktynina (ryc. 11.16). We wstawce mięśnia sercowego występują pasma zwierające. Nazwę pasma w połączeniach komórkowych stosuje się, gdy połączenie występuje na pewnej powierzchni, ale nie tworzy obwódki.

Desmosomy są punktowymi połączeniami międzykomórkowymi typu zwierającego. Połączenia te występują przede wszystkim między komórkami nabłonka (szczególnie dużo jest ich między komórkami warstwy kolczystej naskórka) i we wstawkach mięśnia sercowego. Ogólny plan budowy cząsteczkowej desmosomu przypomina obwódki



Rycina 11.16 Połączenia zwierające komórek nabłonkowych: **a**. do desmosomu i hemidesmosomu są przyłączone filamenty cytokeratynowe (*zielone*), a do obwódek zwierających i przyczepów ogniskowych – filamenty aktynowe (*niebieskie*); **b**. i **c**. białka pośredniczące w łączeniu filamentów aktynowych w obwódce zamykającej i przyczepie ogniskowym; błony komórkowe niebieskie (wg B. Alberts i wsp.).

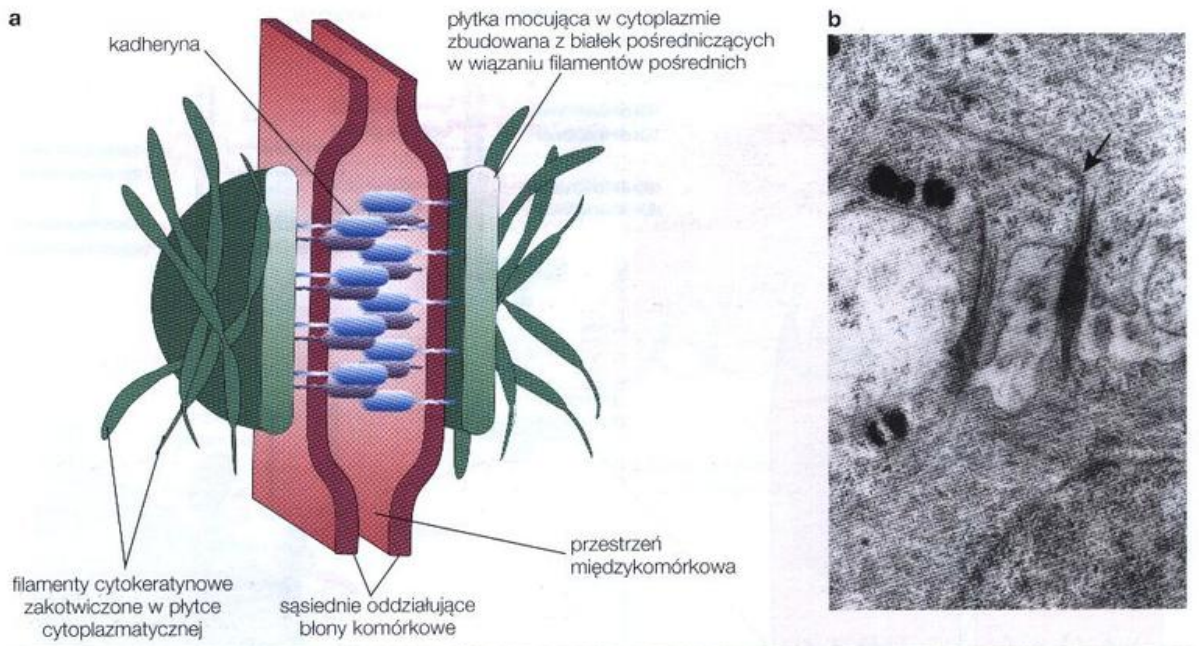
zwierające, ale poszczególne białka są różne. Białka transbłonowe, których domeny pozakomórkowe sąsiednich komórek łączą się ze sobą, są szczególną odmianą kadheryn i nazywa się je **desmogleinami** lub **desmokolinami**. Domeny cytoplazmatyczne łączą filamenty pośrednie, cytokeratynowe lub desminowe, a białkami pośredniczącymi są **desmoplakina**, plaktoglobina i plektyna, tworzące pod błoną gęstą płytkę mocującą (ryc. 11.17).

KLINIKA

Znane są choroby naskórka wywołane przez autoprzeciwciała skierowane przeciwko desmogleinom. W **pęcherzycy zwykłej** (*pemphigus vulgaris*) przeciwciała są skierowane przeciwko desmogleinie 1, a w **pęcherzycy liściastej** (*pemphigus foliaceus*) przeciwko desmogleinie 3. W obu chorobach desmogleiny są zablokowane i nie mogą tworzyć desmosomów. Komórki naskórka tracą łączność, co prowadzi do pojawiania się pęcherzy, które następnie pękają i są przyczyną uciążliwych nadżerek i zmian wtórnych.

Hemidesmosomy (półdesmosomy) są punktowymi połączeniami typu zwierającego między komórkami i cząsteczkami ECM błon podstawnych. Mimo dużego podobieństwa w obrazie z mikroskopu elektronowego do połowy desmosomu (stąd nazwa), hemidesmosomy mają inną budowę cząsteczkową. Białkami transbłonowymi są tutaj **integryny** łączące się z lamininą błony podstawnej (np. $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 6\beta 4$ – zwane ogólnie receptorami **laminy**, oraz dystroglikany w mięśniach). Podobnie jak w desmosomach, do połączenia tego są przyczepione filamenty pośrednie (np. w tkance nabłonkowej są to filamenty keratynowe, czyli tonofilamenty), a białkami pośredniczącymi są słabo poznane białka z rodziny desmoglobin (ryc. 11.18).

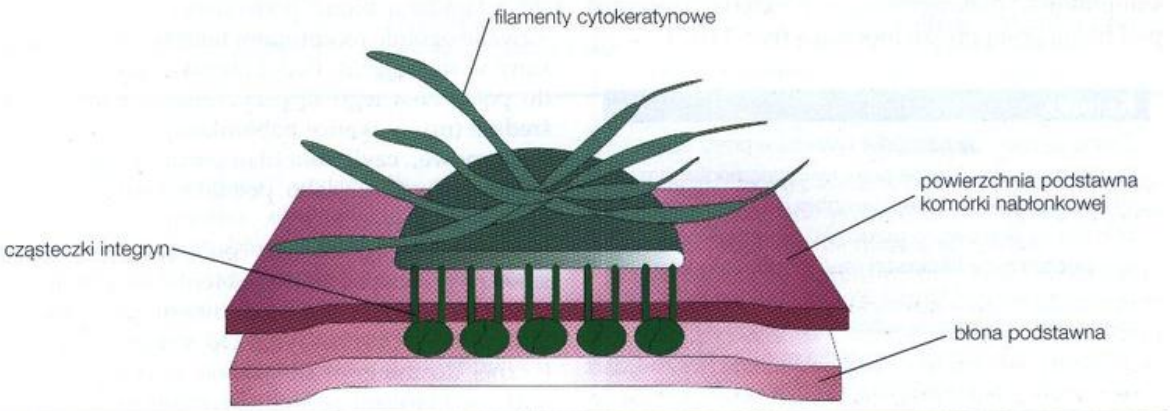
Przyczepy ogniskowe, podobnie jak hemidesmosomy, łączą komórki nabłonkowe z błoną podstawną. Białkiem transbłonowym jest **integryna** łącząca się z fibronektyną. Od strony cytoplazmatycznej do integryn dołączone są filamenty aktynowe, a białkami pośredniczącymi są α-aktynina, winkulina i talina (ryc. 11.16).



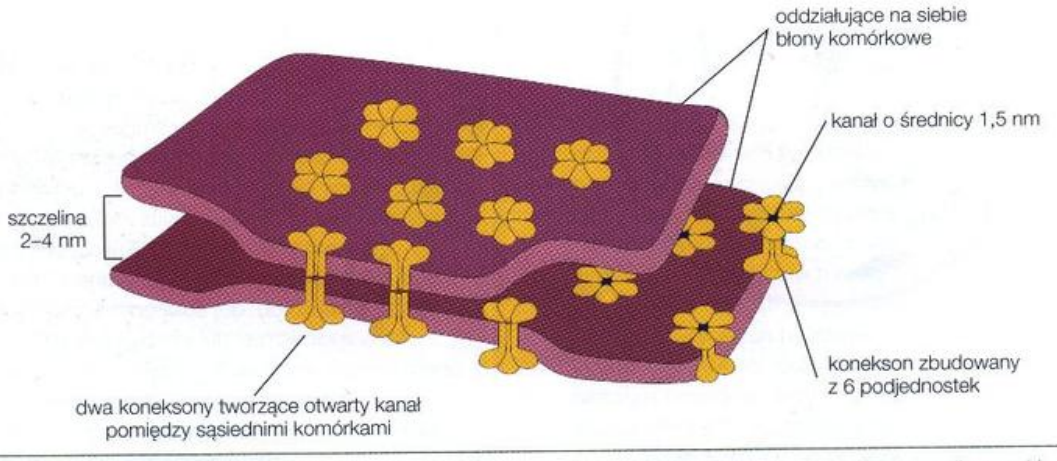
Rycina 11.17 Desmosom: **a.** molekularna budowa desmosomu (wg Alberts B i wsp.); **b.** fragmenty dwóch sąsiednich komórek połączonych desmosomami, do których dochodzą pęczki filamentów pośrednich (*strzałka*). Elektronogram dzięki uprzejmości prof. B. Brelińskiej i dr A. Malińskiej.

Połączenia jonowo-metaboliczne

Połączenia jonowo-metaboliczne, zwane także połączeniami typu **neksus**, występują w większości tkanek. Zbudowane są z białek zwanych koneksynami. Sześć takich białek buduje otwarty, tkwiący w błonie komórkowej cylinder, zwany koneksonem. **Koneksony** sąsiednich komórek łączą się ze sobą, wytwarzając bezpośredni kanał łączący komórki (ryc. 11.19). Zespół regularnie ułożonych koneksonów wytwarza większą strukturę, zwaną neksus, widoczną w mikroskopie elektronowym. Kanały wytworzone przez koneksony pozwalają na dyfuzję między komórkami cząsteczek mniejszych niż 1 kD, w tym jonów i cząsteczek sygnałowych, np. cAMP. Najbardziej typowe połączenia typu neksus obserwuje się między komórkami nabłonków, mięśni gładkich i we wstawkach łączących komórki mięśnia sercowego.



Rycina 11.18 Hemidesmosom (półdesmosom); wiązki filamentów cytokeratynowych łączą się z silną błoną podstawną za pomocą integryn (wg B. Alberts i wsp.).



Rycina 11.19 Połączenia informacyjno-metaboliczne, zwane także połączeniami komunikacyjnymi, połączeniami szczelinowymi (*gap junction*) lub połączeniami typu neksus. Schemat molekularny połączenia, pokazujący kanały utworzone przez koneksony (wg B. Alberts i wsp.).

KLINIKA

Występuje kilkadziesiąt genów dla lizoform koneksyny specyficznych narządowo. Dlatego każda z mutacji wywołać może różne choroby, np. głuchotę, ślepotę, zaburzenia kostnienia czy też neuropatię demielizacyjną zwaną **chorobą Charcota, Marie'a i Tootha**.

Inne połączenia

Omówione wyżej połączenia występują często w większych zespołach, które nazywa się **połączeniami złożonymi**. Występują na przykład między enterocytami, tworząc listewki graniczne, w skład których wchodzą obwódka zamykająca, obwódka przylegania i desmosomy, lub między komórkami sercowymi we włóknach, tworząc wstawki zbudowane z plamek zwierających, desmosomów i połączeń typu neksus.

Obok wyżej opisanych trwałych połączeń międzykomórkowych, są także **połączenia przejściowe**. Są to krótkotrwałe połączenia między komórkami lub z ECM ułatwiające rozpoznawanie i migrację komórek. Połączenia te powstają najczęściej między komórkami różnego typu, np.: leukocytami i komórkami śródbłonka, migrującymi komórkami nowotworowymi i komórkami śródbłonka lub ECM, czy też w rozwoju między aksonami a komórkami glejowymi lub cząsteczkami ECM. Połączenia te są głównie tworzone przez selektyny i IgCAM, rzadziej integryny i wyjątkowo przez kadheryny. Pojawianie się tych cząsteczek adhezyjnych lub ich znikanie z błony komórkowej może być indukowane np. przez czynniki wzrostu lub powstawanie innych połączeń między komórkami (zob. niżej). Połączenia takie wyjątkowo tworzą większe kompleksy widoczne w mikroskopie elektronowym, np. przyczepy ogniskowe.

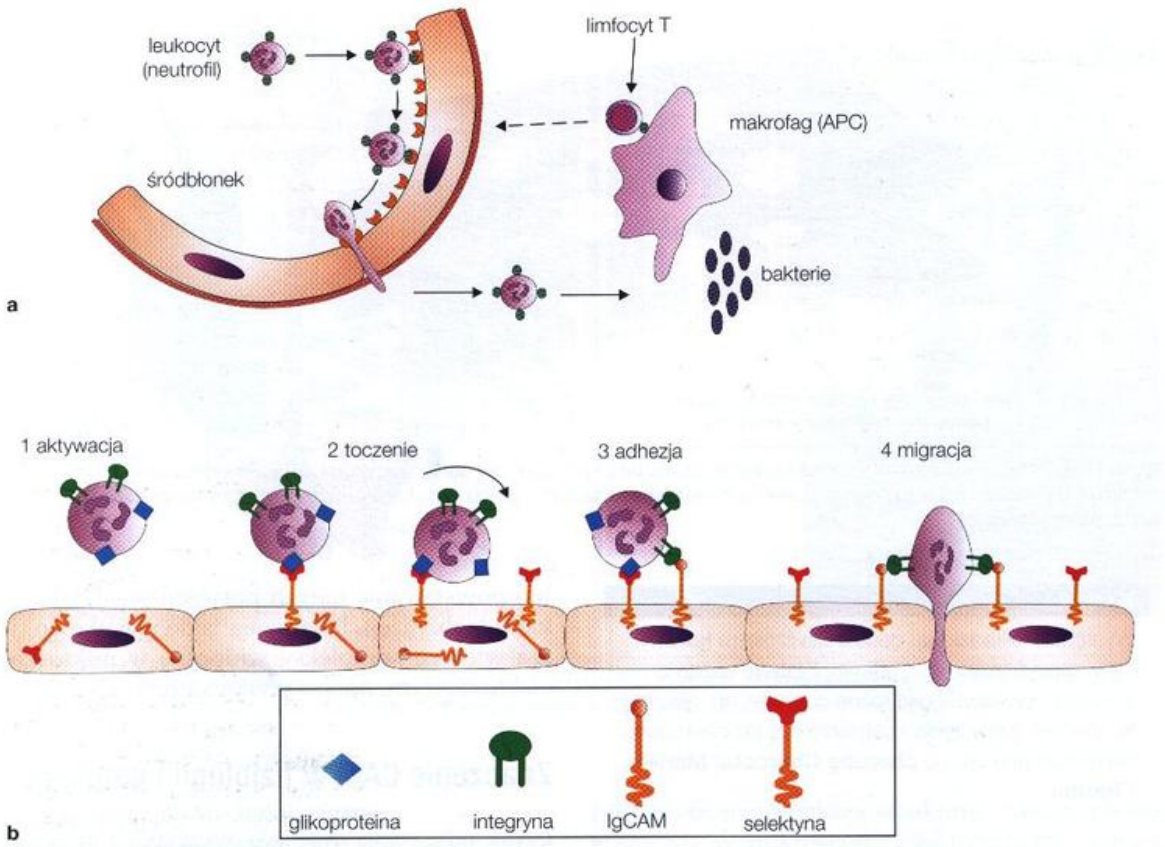
Znaczenie CAM w fizjologii i patologii

CAM odgrywają rolę we wszystkich procesach, w których dochodzi do bezpośredniego kontaktu między komórkami lub składnikami ECM. Część z nich przedstawiono przy opisie poszczególnych cząsteczek. Tutaj są podane niektóre procesy ważne z medycznego punktu widzenia, w których CAM odgrywają zasadniczą rolę.

Wędrówka leukocytów przez ścianę naczynia krwionośnego

KLINIKA

Zakażenie drobnoustrojami lub uszkodzenie tkanek czynnikami fizycznymi i chemicznymi wywołuje miejscową obronę tkankową zwaną **ostrym zapaleniem**. Ważną rolę w tym procesie odgrywają leukocyty, które zapobiegają rozszerzaniu się procesu, niszczą drobnoustroje (np. bakterie) i usuwają zniszczone komórki. Umożliwia to następnie regenerację tkanek i zagojenie się zaatakowanego miejsca. Proces ten wymaga, aby do tego miejsca dotarły odpowiednie leukocyty, głównie neutrofile i monocyty (ryc. 11.20 a). Dzieje się to pod wpływem substancji wydzielanych przez fagocytujące makrofagi tkankowe i cząsteczki



Rycina 11.20 Leukocyty przechodzące z naczynia do ogniska zapalnego: **a.** cytokiny wydzielane przez makrofagi i limfocyty aktywują komórki śródbłonka, wskazując leukocytom miejsce opuszczania naczynia; **b.** migracja leukocytów przez śródbłonek jest zapoczątkowana przez cytokiny: w aktywowanym śródbłonku dochodzi do ekspresji selektyn i IgCAM – 1; obecne na leukocytach glikoproteiny są wiązane luźno przez selektyny i dochodzi do tzw. toczenia się leukocytów po śródbłonku – 2; ten kontakt aktywuje integryny leukocytów, które silniej wiążą IgCAM i dochodzi do adhezji leukocytów – 3 i migracji między komórkami śródbłonka – 4.

uwolnione z rozpadających się komórek. Substancje te, m.in. TNF-alfa (*tumor necrosis factor-alfa*) i IL-1 (interleukina-1), powodują zmianę ładunku elektrycznego powierzchni komórek śródbłonka naczyń krwionośnych, na których wiąże się i aktywuje białko osocza nazywane czynnikiem XII (Hagemana). Czynnik XII aktywuje prekalikreinę osoczową, a kalikreina uwalnia kininy z białek nazywanych kininogenami. **Kininy** powodują: (1) powstanie szczelin między komórkami śródbłonka, przez które białka osocza przenikają do tkanki otaczającej wywołując **obrzęk**, (2) aktywację w komórkach śródbłonka syntazy tlenku azotu (NO), który dyfunduje do komórek mięśni gładkich naczynia wywołując ich rozkurcz, a tym samym większy przepływ krwi przez naczynie i objaw **zaczerwienienia**, (3) drażnienie bólowych zakończeń nerwowych, co jest przyczyną **bólu**. Zaczerwienienie, obrzęk i ból to charakterystyczne objawy zapalenia opisywane już w starożytności.

Aktywowane komórki śródbłonka wskazują także miejsca, którymi leukocyty mają opuścić naczynie krwionośne. W tych komórkach śródbłonka są wbudowywane na powierzchni selektyny wyłapujące leukocyty z odpowiednimi glikoproteinami (np. zawierającymi grupy sialyl-Lewis-x). Powoduje to słabe przyczepianie się leukocytów i ich toczenie się po śródbłonku (ryc. 11.20 a, b). Kontakt tych komórek aktywuje następnie integryny (najczęściej $\alpha 4\beta 1$ i LFA-1, *lymphocyte function-associated antigen-1*) leukocytów i ich połączenie z cząsteczkami IgCAM lub VCAM śródbłonka. Dzięki temu dochodzi do silniejszego przytwierdzenia się leukocytów, wciskania się do szczelin między komórkami śródbłonka

i ich wyjścia poza naczynie, w czym pomocne są pojawiające się na błonie leukocytów integryny, np. $\alpha_6\beta_1$. Mechanizm ten umożliwia nagromadzenie się leukocytów w zagrożonym miejscu i obronę organizmu. Czasami jednak proces taki jest niekorzystny, np. podczas reperfuzji. Jeżeli tkanka zostanie dłużej niedotleniona (np. zawał serca na skutek zamknięcia tętnicy wieńcowej), to następuje uszkodzenie i rozpad komórek. Zbyt późne przywrócenie unaczynienia, czyli reperfuzja (np. udrożnienie tętnicy wieńcowej chirurgicznie lub farmakologicznie), spowoduje, że w wyniku działania wyżej opisanego mechanizmu dojdzie do nagromadzenia się leukocytów i pogłębienia uszkodzenia, nazywanego **uszkodzeniem reperfuzyjnym**.

Tworzenie skrzepu

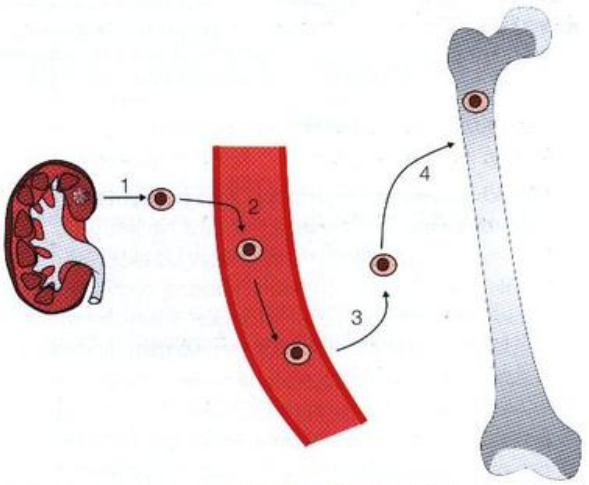
KLINIKA

W miejscu uszkodzenia naczynia krwionośnego płytki krwi przyczepiają się do składników ECM (fibronektyny i kolagenu), co prowadzi do aktywacji integryn ($\alpha 2b\beta 3$) na ich powierzchni. Aktywowane integryny wiążą krążący we krwi fibrynogen. Fibrynogen ma dwa miejsca do wiązania integryn i przyłącza następne płytki, a te dalsze cząsteczki fibrynogenu. Wytwarza się zbita sieć zbudowana z płytek krwi połączonych cząsteczkami fibronektyn. Jest to skrzep zamykający uszkodzone naczynie i hamujący krwawienie.

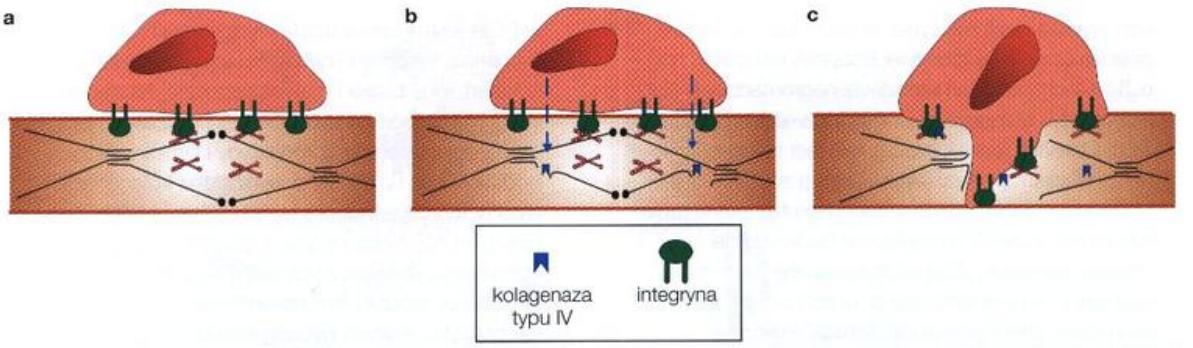
Tworzenie przerzutów nowotworowych

KLINIKA

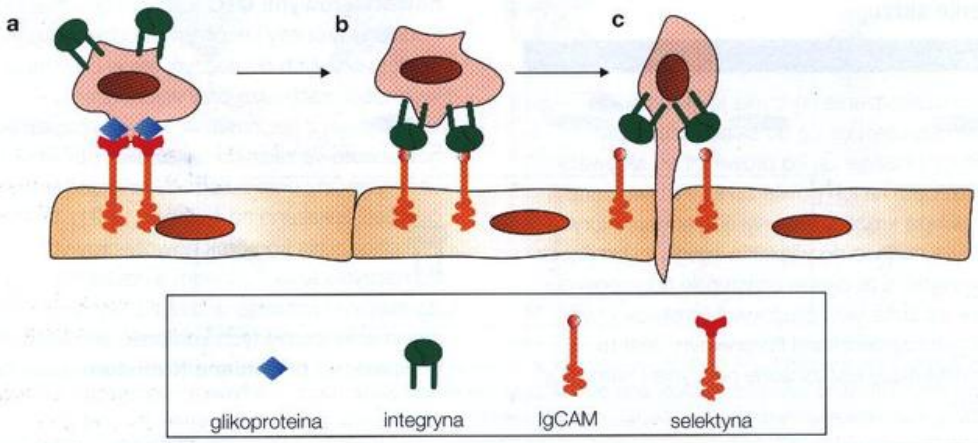
Nowotwory powstają na skutek utraty kontroli nad cyklem komórkowym. Komórki dzielą się nadmiernie i tworzą guz. Choroba staje się szczególnie groźna, gdy komórki guza pierwotnego dają przerzuty, czyli utworzą guzy wtórne w innych narządach (ryc. 11.21). Zasadniczą rolę w tworzeniu przerzutów odgrywają cząsteczki adhezyjne. W pierwszym etapie tego procesu dochodzi do utraty połączeń międzykomórkowych w obrębie guza, co stwarza możliwość odrywania się komórek. Stwierdzono, że najczęstszą przyczyną jest brak ekspresji kadheryny E lub kateniny, co jest przyczyną zaniku połączeń zwierających i komórka staje się „wolna". Komórka taka opuszcza je w innych narządach. W obu przypadkach komórka nowotworowa musi pokonać barierę ECM, błonę podstawną naczyń i warstwę komórek śródbłonka. Przemieszczanie się komórek w ECM jest możliwe dzięki wydzielaniu metaloproteinaz, katepsyn i hialuronidazy rozkładających kolagen, inne białka i makrocząsteczki. Następnie integryny komórki nowotworowej umożliwiają jej przyczepianie się do fibronektyny i lamininy błon podstawnych naczynia, a wydzielana kolagenaza typu IV niszczy strukturę tej błony (ryc. 11.22). Glikoproteiny błonowe (np. z grupami sialyl-Lewis-x) komórek nowotworowych łączą się z selektynami E komórek śródbłonka, co aktywuje integryny komórek nowotworowych tworzące teraz silniejsze połączenia z IgCAM komórek śródbłonka. Połączenia te ułatwiają także komórkom nowotworowym przeciskanie się między komórkami śródbłonka i wejście do naczynia. Komórki nowotworowe znajdujące się w naczyniach nazywamy **krążącymi komórkami nowotworowymi CTC** (*circulating tumor cells*). Podobne procesy jak przy wchodzeniu komórek nowotworowych do naczyń, ale w odwrotnej kolejności, zachodzą przy wychodzeniu komórki nowotworowej z naczynia. W nowym miejscu komórka nowotworowa zaczyna się dzielić i powstaje guz wtórny zwany przerzutem. Ważniejsze etapy tego procesu pokazano na rycinach 11.21, 11.22 i 11.23. Przechodzenie komórek nowotworowych z guza do naczynia krwionośnego, a następnie z naczynia do miejsca tworzenia przerzutu, wymaga licznych zmian w fenotypie tych komórek, co nazywamy odpowiednio **przemianą (transformacją) na-**



Rycina 11.21 Droga komórek nowotworowych z guza pierwotnego w nerce do kości, gdzie powstaje guz wtórny (przerzut). Komórki muszą oderwać się od guza – 1, przejść do naczynia krwionośnego – 2, opuścić naczynie – 3 i utworzyć nowy guz – 4. Na wszystkich etapach tworzenia przerzutu zasadniczą rolę odgrywają cząsteczki adhezyjne.



Rycina 11.22 Komórka nowotworowa przechodząca przez błonę podstawną naczynia krwionośnego: **a**. integryny na komórce nowotworowej wiążą się z lamininą i umożliwiają przyczepienie się ich do błon podstawnych; **b**. wydzielana kolagenaza typu IV niszczy sieci zbudowane z kolagenu typu IV; **c**. komórka może przejść przez zniszczoną błonę podstawną.



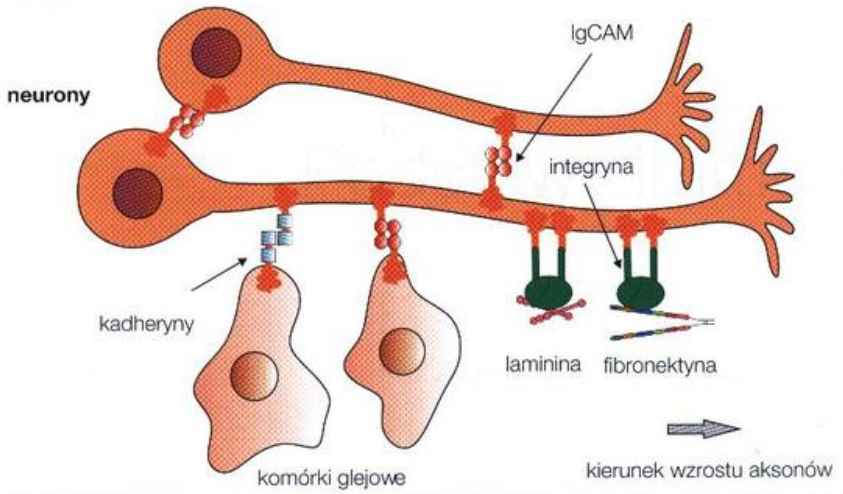
Rycina 11.23 Komórka nowotworowa wychodząca z naczynia krwionośnego: **a**. w miejscu ekspresji selektyn następuje przyleganie komórek nowotworowych, mających na swojej powierzchni odpowiednie glikoproteiny; **b**. aktywacja integryn i łączenie z IgCAM śródbłonka; **c**. migracja między komórkami śródbłonka (zob. ryc. 11.20).

błonkowo-mezenchymalną i **mezenchymalno-nabłonkową.** Tworzenie przerzutów nie jest więc procesem przypadkowym, ale zależy od ekspresji cząsteczek adhezyjnych, których rodzaj decyduje o miejscu lokalizacji guzów wtórnych. Klasycznym przykładem są komórki nowotworowe raka gruczołu sutkowego, które najczęściej na swojej powierzchni wykazują ekspresję receptora CXCR4, a miejscem przerzutów są dla nich głównie kości, gdyż śródbłonek naczyń szpiku kostnego posiada na powierzchni odpowiedni ligand CXCL12.

CAM w rozwoju układu nerwowego

Rola CAM w rozwoju znana jest od wielu lat. Pierwsze doświadczenia na zawiązkach mózgu i oka zarodków zwierząt pokazały, że rozdzielone mechanicznie lub enzymatycznie komórki agregują ponownie w hodowlach komórkowych według powtarzającego się wzoru. Na przykład komórki siatkówki tworzą ponownie agregaty i to nawet w mieszaninie z innymi komórkami. Następnie pokazano, że za połączenia te są odpowiedzialne CAM. Dalsze badania pozwoliły na dokładniejsze określenie ich roli w rozwoju wszystkich narządów.

Obserwacje na zwierzętach, którym w czasie rozwoju chirurgicznie dokonano zmian w obrębie układu nerwowego lub w położeniu narządów docelowych pokazały, że trafianie aksonów do właściwego miejsca nie może być dziełem przypadku. Wykazano, że np. aksony z siatkówki trafiają do odpowiedniego miejsca w mózgu, mimo tworzonych



Rycina 11.24 Rola CAM w rozwoju układu nerwowego. NCAM i inne z rodziny IgCAM łączą komórki nerwowe między sobą oraz odgrywają ważną rolę we wzroście aksonów między komórkami glejowymi lub wzdłuż innych aksonów. Kadheryny N umiejscawiają neurocyty i aksony między komórkami glejowymi, a integryny ułatwiają odnalezienie właściwej drogi wśród cząsteczek ECM.

przeszkód. Zmiany położenia mięśni lub zmiany położenia motoneuronów w rdzeniu kręgowym u wczesnych płodów nie są przeszkodą w wytworzeniu właściwego unerwienia. Zasadniczą rolę w ukierunkowaniu wzrostu aksonów przypisuje się czynnikom wzrostu oraz cząsteczkom adhezyjnym. Czynniki wzrostu (np. NGF – ang. *nerve growth factor* i neurotrofina) są wydzielane przez komórki docelowe. Czynniki te działają na najbliższe otoczenie i wpływają głównie na przeżycie neuronów i utrzymanie połączenia akson–komórka docelowa. Cząsteczki adhezyjne biorą natomiast udział we właściwym ukierunkowaniu wzrastających aksonów. Zaangażowane tu są kadheryny, integryny i wiele typów cząsteczek IgCAM (ryc. 11.24). Kadheryny N są odpowiedzialne za wzrost aksonów między astrocytami, integryny ukierunkowują wzrost aksonów w ECM, a IgCAM biorą udział we wzroście aksonów wzdłuż innych aksonów oraz utrzymują spoistość osłonek mielinowych. Wykazano również, że podczas tworzenia synaps ważną rolę odgrywają N i E kadheryny, które potem utrzymuja spoistość tych struktur. Ważną role mechaniczną i czynnościową w synapsach odgrywa natomiast cząsteczka SynCAM 1, której przypisuje się znaczenie w plastyczności i procesach uczenia się.

Piśmiennictwo

Gos M., Miłoszewska J., Przybyszewska M.: *Rola przejścia epitelialno-mezenchymalnego w progresji nowotworu*. Post. Bioch. 2009, 55, 121–128.

Hinek A., Hinek A.: *Funkcje biologiczne receptora elastynowego*. Post. Biol. Kom. 1996, 23, 243–259.

Kitlińska J., Wojcierowski J.: *Cząsteczki adhezyjne w nowotworach jelita grubego*. Post. Biol. Kom. 1996, 23, 705–716.

Maśliński S., Ryżewski J.: *Patofizjologia kliniczna*, PWN, Warszawa 2007.

Moving out: Invasion and Metatasis [w:] *The Biology of Cancer* (Weinberg RA), 2nd ed. Garland Science New York and London 2014, 641–722.

Tkanki i nowotwory [w:] *Podstawy biologii komórki* (Alberts B. i wsp.). Wyd. Nauk. PWN, Warszawa, 2005, cz. 2., 697–740.

Wójcik C.: *Udział cząsteczek adhezyjnych w wybranych procesach rozwojowych*. Post. Biol. Kom. 1997, 24, 145–171.

ROZDZIAŁ 12

Podstawy immunologii

Agnieszka Malińska, Ewa Jagoda

HASŁA

Antygen

Substancja charakteryzująca się antygenowością i immunogennością. Antygenowość to zdolność substancji do swoistego wiązania się z immunoglobulinami lub receptorami limfocytów T lub B, co powinno skutkować wywołaniem specyficznej odpowiedzi immunologicznej (immunogenność). Specyficzna część antygenu, która decyduje o jego swoistym wiązaniu do przeciwciała lub receptora na limfocycie, nosi nazwę **epitopu** lub **determinanty antygenowej**.

Białka ostrej fazy

Białka osocza krwi powstają podczas zakażenia lub uszkodzenia tkanki. Głównym białkiem ostrej fazy jest białko C-reaktywne, które wiąże się z polisacharydami otoczek bakteryjnych, ułatwiając m.in. fagocytozę mikroorganizmów przez komórki żerne.

Cytokiny

Rozpuszczalne mediatory reakcji immunologicznych, umożliwiają wzajemne komunikowanie się, oddziaływanie i kooperację między komórkami układu immunologicznego. **IFN** (interferony) – glikoproteiny wyspecjalizowane w hamowaniu replikacji wirusa. **IL** (interleukiny) – ukierunkowują komórki układu immunologicznego do proliferacji, dojrzewania i różnicowania. **Limfokiny** – cytokiny syntetyzowane przez limfocyty. **Monokiny** – cytokiny syntetyzowane przez makrofagi.

Defenzyny

Białka kationowe o silnym działaniu przeciwbakteryjnym i przeciwgrzybicznym.

Dopełniacz (ang. *complement*)

Nieaktywne białka (proenzymy) osocza krwi uczestniczące w humoralnych reakcjach obronnych organizmu. Ich biologiczne właściwości ujawniają się po aktywacji (droga klasyczna i alternatywna). **Klasyczna droga aktywacji dopełniacza** to aktywacja dopełniacza przez kompleks antygen-przeciwciało. **Alternatywna droga aktywacji dopełniacza** – aktywacja dopełniacza przez np. polisacharydy otoczki bakteryjnej, endotoksyny. Rozpoczyna się od składnika C3 z pominięciem składników C1, C2, C4. **Droga lektynowa aktywacji dopełniacza** – inicjowana jest przez białko wiążące mannozę.

Komórka NK (ang. *natural killer*)

Komórka posiadająca zdolność spontanicznego zabijania komórek nowotworowych i zakażonych wirusem.

Komórki odpowiedzi immunologicznej

Niejednorodna grupa komórek, które zaangażowane są w generowanie specyficznej, ukierunkowanej odpowiedzi immunologicznej. Głównymi komponentami komórkowymi swoistej odpowiedzi immunologicznej są limfocyty T i B oraz liczne komórki uczestniczące w prezentacji antygenu (komórki dendrytyczne). Komórkami biorącymi udział w odpowiedzi nieswoistej są makrofagi, granulocyty i komórki NK. Ze względu na rolę w procesach dojrzewania limfocytów, do komórek układu immunologicznego zalicza się również komórki zrębu grasicy i mikrośrodowiska szpiku kostnego.

Laktoferyna

Białko wiążące żelazo, które jest niezbędne do prawidłowego funkcjonowania bakterii.

Lizozym (muramidaza)

Enzym o silnym działaniu bakteriobójczym.

MHC

Cząstecki głównego układu zgodności tkankowej odpowiedzialne za prezentację epitopów białkowych w postaci rozpoznawalnej przez receptory limfocytów T. Wyróżnia się dwie klasy: MHC klasy I – obecne na powierzchni wszystkich komórek jądrzastych, odpowiedzialne za prezentację antygenów endogennych komórki, oraz MHC klasy II, których ekspresją charakteryzują się komórki profesjonalnie prezentujące antygeny pochodzenia egzogennego w komórce.

Klon komórek

Grupa identycznych genetycznie komórek wywodząca się z jednej komórki wyjściowej.

Odpowiedź nabyta (swoista)

Oparta na aktywności immunokompetentnych limfocytów T i B oraz przeciwciał wytwarzanych przez limfocyty B. Charakteryzuje się specyficznością, pamięcią immunologiczną, różnorodnością, zdolnością do samoograniczania oraz tolerancją immunologiczną.

Odpowiedź wrodzona (nieswoista)

Stanowi pierwszą linię obrony organizmu przed patogenami. Jest oparta na szybko aktywowanych, ale mało precyzyjnych mechanizmach, które nie prowadzą do wytworzenia pamięci immunologicznej. Jest uwarunkowana istnieniem zarówno czynników humoralnych (regulatorów odporności), jak i barier fizycznych i chemicznych oraz komórek. Do głównych komponentów komórkowych odpowiedzi wrodzonej zalicza się: monocyty, makrofagi, granulocyty oraz inne, bliżej niezwiązane z układem odpornościowym komórki, np. nabłonkowe.

Przeciwciało (immunoglobulina)

Podstawowy element odpowiedzi typu humoralnego. Jest to substancja białkowa produkowana przez komórki plazmatyczne wykazująca zdolność do rozpoznawania i wiązania się z antygenem.

TNF (ang. *tumor necrosis factor*)

Czynnik martwicy nowotworów (kachektyna), działa cytotoksycznie na komórki.

Mechanizmy odporności wrodzonej (nieswoistej)

Układ immunologiczny jest starannie zaprogramowany do obrony organizmu przed inwazją drobnoustrojów (bakterie, wirusy, grzyby i pasożyty), jak również przed rozwojem chorób nowotworowych. Podstawę odporności stanowi umiejętność rozpoznawania własnych składników organizmu i eliminowania elementów obcych ustrojowi. W układzie immunologicznym wyróżnia się dwa typy odpowiedzi odpornościowej: nieswoistą (wrodzoną, naturalną) oraz swoistą (nabytą). Odporność naturalna jest starym filogenetycznie mechanizmem obrony i charakteryzuje się szybką reakcją odpowiedzi. Stanowi stałe zabezpieczenie przed zakaźnymi mikroorganizmami i odgrywa ważną rolę w chorobach o podłożu zapalnym. Jej swoistość polega na wczesnym rozpoznawaniu cząsteczek występujących na drobnoustrojach (tzw. molekularne wzorce występujące na patogenach -PAMP; (zob. niżej). Odporność wrodzoną zapewnia organizmowi istnienie: barier fizycznych i chemicznych, czynników humoralnych – regulatorów odporności naturalnej i komórek.

Bariery fizyczne i chemiczne

Jednym z najprostszych mechanizmów odporności wrodzonej jest wykorzystywanie naturalnych barier tkankowych i narządowych, mających bezpośredni kontakt ze środowiskiem zewnętrznym.

Skóra jest pierwszą, istotną barierą zapobiegającą wnikaniu różnorodnych mikroorganizmów, a także stanowi ochronę przed wpływem niekorzystnych czynników zewnętrznych. Powierzchniową barierę naskórkową charakteryzuje obecność keratyny (produkt końcowy różnicowania się komórek naskórka). Naskórek chroni organizm przed zakażeniami i urazami. Ponadto komórki naskórka (keratynocyty) w wyniku pobudzenia receptorów TLR (*toll-like receptor*, zob. niżej) syntetyzują defenzyny (naturalne antybiotyki peptydowe) i szereg prozapalnych cytokin (zob. niżej). Stałe złuszczanie komórek naskórka ułatwia pozbywanie się drobnoustrojów bytujących w skórze. Poza tym gruczoły skóry (łojowe, potowe) wydzielają bakteriobójcze kwasy tłuszczowe i kwas mlekowy, w ten sposób zakwaszają środowisko, co jest niekorzystne dla bakterii.

Wydzielina śluzowa pokrywająca drogi układu pokarmowego zawiera enzymy przeciwbakteryjne, m.in. lizozym wydzielany przez gruczoły przełyku, komórki Panetha gruczołów jelitowych, a także ślinianki. Istotną rolę ochrony przed drobnoustrojami w ślinie pełnią także defenzyny i laktoferyna. Ponadto, niskie pH soku żołądkowego, śluzu obecnego w pochwie, a także moczu i występujące w nim defenzyny zabezpieczają organizm przed agresją czynników chorobotwórczych.

W układzie oddechowym funkcja przeciwbakteryjna przypisywana jest niektórym białkom surfaktanta, wydzieliny syntetyzowanej przez komórki Clary, a także lepkiemu śluzowi, który wiąże cząsteczki antygenowe. Ponadto komórki migawkowe obecne w nabłonku oddechowym ułatwiają eliminowanie zanieczyszczeń i drobnoustrojów dostających się wraz z wdychanym powietrzem.

Czynniki humoralne (regulatory odporności wrodzonej)

Lizozym

Zwany także **muramidazą,** jest enzymem o silnym działaniu litycznym w stosunku do bakterii. Obecny jest w ziarenkach neutrofilów, makrofagów, monocytów i komórek Panetha nabłonka jelita cienkiego. Oprócz wymienionych komórek występuje również w wydzielinach śluzowo-surowiczych układu oddechowego, w osoczu, łzach i ślinie. Ze względu na powszechność występowania, a przede wszystkim funkcje bakteriobójcze (rozkłada peptydoglikany otoczki bakterii Gram-dodatnich), jest jednym z najważniejszych czynników nieswoistych mechanizmów odporności.

Defenzyny

Są dużymi białkami kationowymi i są określane jako naturalne antybiotyki. Syntetyzowane są przez makrofagi, neutrofile, komórki NK, komórki Panetha, komórki nabłonkowe, a także keratynocyty. Pełnią wiele istotnych funkcji w mechanizmach odporności nieswoistej: regulują aktywację dopełniacza, wzmagają działanie chemotaktyczne, zwłaszcza komórek dendrytycznych, a przede wszystkim mają silne działanie przeciwbakteryjne i przeciwgrzybicze. Mechanizm działania tych naturalnych antybiotyków polega na uszkadzaniu i tworzeniu otwartych kanałów w otoczkach niszczonych drobnoustrojów. Innym czynnikiem zaangażowanym w mechanizmach odporności nieswoistej jest **laktoferyna**. Występuje głównie w ziarenkach granulocytów obojętnochłonnych, a także w wydzielinach śluzowo-surowiczych, łzach i nasieniu. Jej działanie polega na wiązaniu żelaza, które jest niezbędne do prawidłowego funkcjonowania bakterii.

Białka ostrej fazy

Białka ostrej fazy powstają podczas zapalenia, zakażeń, a także urazów. Syntetyzowane są głównie przez hepatocyty, chociaż inne komórki, np. monocyty, mogą również wytwarzać niektóre z nich. Wiele mediatorów jest zaangażowanych w regulację stężenia tych białek w osoczu krwi. Główną cytokiną odpowiedzialną za ten proces jest interleukina IL-6, a także TNFα – czynnik martwicy nowotworów, czynniki wzrostu komórek nabłonkowych, interferon gamma – INFγ. Ważnym białkiem ostrej fazy jest tzw. białko C-reaktywne (CRP), które łączy się z powierzchnią drobnoustrojów i martwych komórek, a powstały kompleks uruchamia kaskadę aktywacji dopełniacza. Efektem tego procesu jest chemotaksja i fagocytoza.

Dopełniacz

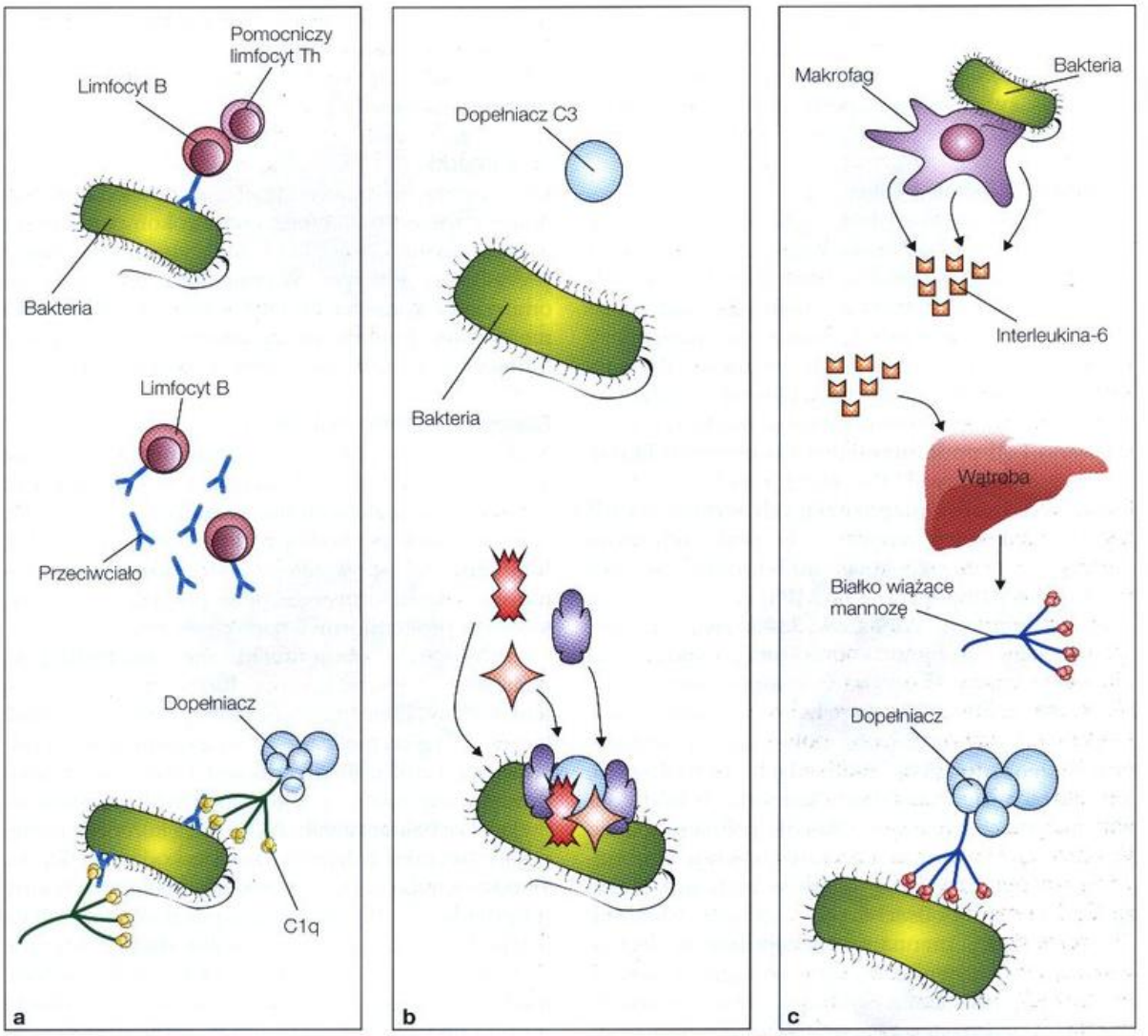
Układ dopełniacza (*complement*) składa się z ok. 20 nieaktywnych białek (proenzymy) osocza krwi, które wywołują humoralną odpowiedź odpornościową, ulegając aktywacji w obecności kompleksu antygen-przeciwciało lub przez polisacharydy pochodzenia bakteryjnego. Poszczególne składowe układu określane są literą C wraz z kolejną cyfrą (C1–C9). Dopełniacz stanowi ścisłe powiązanie pomiędzy wrodzonymi i nabytymi mechanizmami odporności. Jego aktywacja polega na serii enzymatycznych i nieenzymatycznych reakcji o charakterze kaskadowym. W przebiegu złożonego procesu aktywacji powstaje wiele ważnych produktów pośrednich – **konwertaza C3** i **konwertaza C5**, które są niezwykle istotne dla prawidłowego działania dopełniacza. Do najważniejszych funkcji dopełniacza należy zaliczyć: opsonizację (opłaszczanie, np. bakterii, grzybów, pasożytów), chemotaksję i aktywację leukocytów, zabijanie komórek bakteryjnych, aktywację odpowiedzi humoralnej, a w konsekwencji lizę komórki docelowej, ze związanym przeciwciałem, a także umożliwienie komórkom żernym fagocytozy drobnoustrojów. Oprócz tych życiowo ważnych funkcji dopełniacz wchodzi także w interakcję z innymi czynnikami humoralnymi i komórkowymi, wywołując uwolnienie np. histaminy przez komórki tuczne, leukotrienów z granulocytów obojętnochłonnych. Istnieją dwie drogi aktywacji dopełniacza. **Klasyczna droga** zapoczątkowana zostaje przez kompleks antygen–przeciwciało, tak więc niewątpliwie zależy od przeciwciał, które związały determinanty antygenowe. Kompleks antygen–przeciwciało poprzez fragment Fc wiąże składnik C1 (C1 składa się z podjednostek C1q, C1r i C1s) i w ten sposób dochodzi do aktywacji kolejnych składowych dopełniacza (ryc. 12.1 a). Przeciwciała zdolne do aktywacji C1q są to przede wszystkim przeciwciała klasy IgM i IgG. **Droga alternatywna** jest inicjowana bez udziału przeciwciał, a do jej aktywatorów należą bakterie – szczególnie polisacharydy ich otoczek, wirusy oraz zakażone przez nie komórki, grzyby i niektóre komórki nowotworowe (ryc. 12.1 b). Aktywacja rozpoczyna się spontanicznie od składnika C3 – konwertazy, będącej inicjującym enzymem drogi alternatywnej. Aktywacja dopełniacza drogą alternatywną ma znaczenie dla szybkiej odpowiedzi przeciw drobnoustrojom zanim rozwinie się swoista, ale powolniejsza odpowiedź immunologiczna i pojawią się przeciwciała.

Niezależnie jednak od drogi aktywacji, efekt końcowy tych reakcji jest identyczny i doprowadza do wytworzenia **kompleksu atakującego błonę – MAC** (*membrane attacking complex*).

Należy również wspomnieć o aktywacji dopełniacza **drogą lektynową**, która inicjowana jest przez białko wiążące mannozę, zwane lektyną wiążącą mannozę (*mannose binding lectin* – MBL), i w ogólnych zarysach jest podobna do aktywacji drogi klasycznej (ryc. 12.1 c). Białko wiążące mannozę przypomina budową składnik C1q i wykazuje właściwość aktywacji dopełniacza, a także ułatwia fagocytozę opłaszczonych przez siebie drobnoustrojów. MBL należy, podobnie jak białka surfaktanta płucnego, do **kolektyn** – białek mających zdolność do wiązania oligosacharydów na powierzchni mikroorganizmów.

Cytokiny

Stanowią dużą grupę rozpuszczalnych mediatorów reakcji immunologicznych i zapalnych. Służą do przekazywania sygnałów między komórkami (umożliwiają komunikowanie się, wzajemne oddziaływanie i kooperację między komórkami układu immunologicznego). Mogą działać na komórki, które je wydzielają (działanie autokrynowe), na komórki sąsiadujące (działanie parakrynowe) lub na komórki znajdujące się w innych narządach (działanie endokrynowe). Cytokiny nie tylko biorą udział w reakcji zapalnej, ale również pobudzają limfocyty B i T niezbędne do odpowiedzi swoistej. Cytokiny wydzielane przez limfocyty to **limfokiny**, natomiast wytwarzane przez makrofagi i monocyty – **monokiny**. Przedstawiona nomenklatura ma obecnie znaczenie bardziej historyczne, gdyż żadna z cytokin nie jest syntetyzowana wyłącznie przez określony rodzaj komórki. Dużą grupę cytokin stanowią **interleukiny** (**IL**), których rodzaje oznacza się, dodając kolejne cyfry. Interleukiny ukierunkowują komórki układu



Rycina 12.1 Aktywacja układu dopełniacza: **a** – droga klasyczna; 1. Limfocyty B z udziałem receptorów immunoglobulinowych wiążą się z bakterią i ulegają stymulacji przez limfocyty Th; 2. Limfocyty B ulegają proliferacji i różnicują się w komórki plazmatyczne, które wydzielają przeciwciała; 3. Przeciwciała opłaszczają bakterie i fragmentem Fc wiążą się z receptorem składnika C1. **b** – droga alternatywna; 1. Składnik C3 dopełniacza może wiązać cząsteczki otoczki bakteryjnej (własne komórki organizmu są chronione przez białka inaktywujące składową C3); 2. Związanie C3 uruchamia kaskadę dopełniacza. **c** – droga lektynowa; 1. Makrofagi po wykryciu zagrożenia ulegają aktywacji i wydzielają interleukinę IL-6; 2. IL-6 stymuluje komórki wątrobowe do syntezy i wydzielania lektyny – białka wiążącego mannozę; 3. Lektyna wiąże się z mannozą otoczki bakteryjnej i w ten sposób aktywuje dopełniacz.

immunologicznego do proliferacji, dojrzewania i różnicowania. Wielokierunkowe oddziaływanie wykazuje IL-6, która jest syntetyzowana przez makrofagi, monocyty, a także komórki śródbłonka, fibroblasty i keratynocyty. Uważana jest za jedną z ważniejszych cytokin regulujących mechanizmy obronne w odpowiedzi immunologicznej i reakcji zapalnej. **TNFα** – czynnik martwicy nowotworów, jest wytwarzany przez monocyty i makrofagi. Oprócz działania cytotoksycznego i cytostatycznego na komórki prawidłowe i nowotworowe wykazuje wiele właściwości immunomodulujących. Jest jednym z najsilniejszych endogennych aktywatorów neutrofilów i komórek NK, indukuje ekspresję niektórych cząsteczek adhezyjnych na komórkach śródbłonka.

Interferony (INF) to jedne z najważniejszych glikoprotein wyspecjalizowanych w hamowaniu replikacji wirusowego DNA wewnątrz zainfeko-

wanej komórki. Ich funkcja polega na rozpoznaniu infekcji wirusowej oraz aktywacji komórek układu odpornościowego (głównie komórek NK i makrofagów) – zwiększeniu szybkości rozpoznawania infekcji poprzez prezentację antygenu limfocytom.

Receptory Toll-podobne i inne

Po raz pierwszy receptory Toll zostały wykryte w komórkach muszki owocowej, gdzie biorą udział w rozwoju prenatalnym, w prawidłowym ukształtowaniu osi brzuszno-grzbietowej, natomiast u organizmów dojrzałych białko to uczestniczy w reakcjach obronnych tych owadów. Badania z ostatnich lat pozwoliły na wykrycie u ludzi homologicznych receptorów (obecnie około 13), które nazwano **Toll-podobnymi** (*toll-like receptors*; **TLRs**). Poprzez receptory TLRs, które należą do dużej grupy **receptorów rozpoznających wzorce – PRR** (*pattern recognition receptors*), komórki odpowiedzi nieswoistej rozpoznają **molekularne wzorce związane z patogenami – PAMP** (*patogen associated molecular patterns*). Większość TLRs związana jest z powierzchnią błony komórkowej, niektóre zaś znajdują się w pęcherzykach cytoplazmatycznych szeregu komórek. Ich ekspresję wykazano w komórkach dendrytycznych, makrofagach, limfocytach B, eozynofilach, neutrofilach, fibroblastach, adipocytach, keratynocytach, komórkach śródbłonka, komórkach tucznych. Obecnie poznano też ich ligandy, którymi są składniki egzogenne drobnoustrojów (np. flagellina – białko budujące rzęski bakteryjne, lipopolisacharyd – główny składnik ściany bakterii, mannany występujące w ścianie drożdży), jak również ligandy endogenne gospodarza (np. białka szoku cieplnego – HSP, dwuniciowy RNA stanowiący genom niektórych wirusów). Związanie liganda z TLR powoduje wczesną aktywację odporności wrodzonej, inicjację procesu zapalnego poprzez syntezę określonych cytokin, dojrzewanie komórek dendrytycznych prezentujących antygen, poprzez wzrost ekspresji cząsteczek kostymulujących i MHC. Powoduje to większą zdolność prezentacji antygenów i w efekcie aktywuje mechanizmy odporności swoistej z udziałem limfocytów B i T. Receptory Toll-podobne uczestniczą również w samej regulacji odpowiedzi immunologicznej. Bezpośrednio lub pośrednio wpływają na funkcjonowanie komórek Treg, aktywują je do indukowania lub też hamowania odpowiedzi immunologicznej lub też znoszą ich aktywność supresyjną. Gdy receptory TLR zawiodą, odpowiedź immunologiczna się załamuje, pozostawiając organizm całkowicie bezbronnym w obliczu zakażenia. Jeżeli natomiast receptory TLR działają zbyt intensywnie, doprowadza to do wyniszczających, przewlekłych chorób zapalnych, np. zapalenia stawów lub choroby układu krążenia.

Komórki

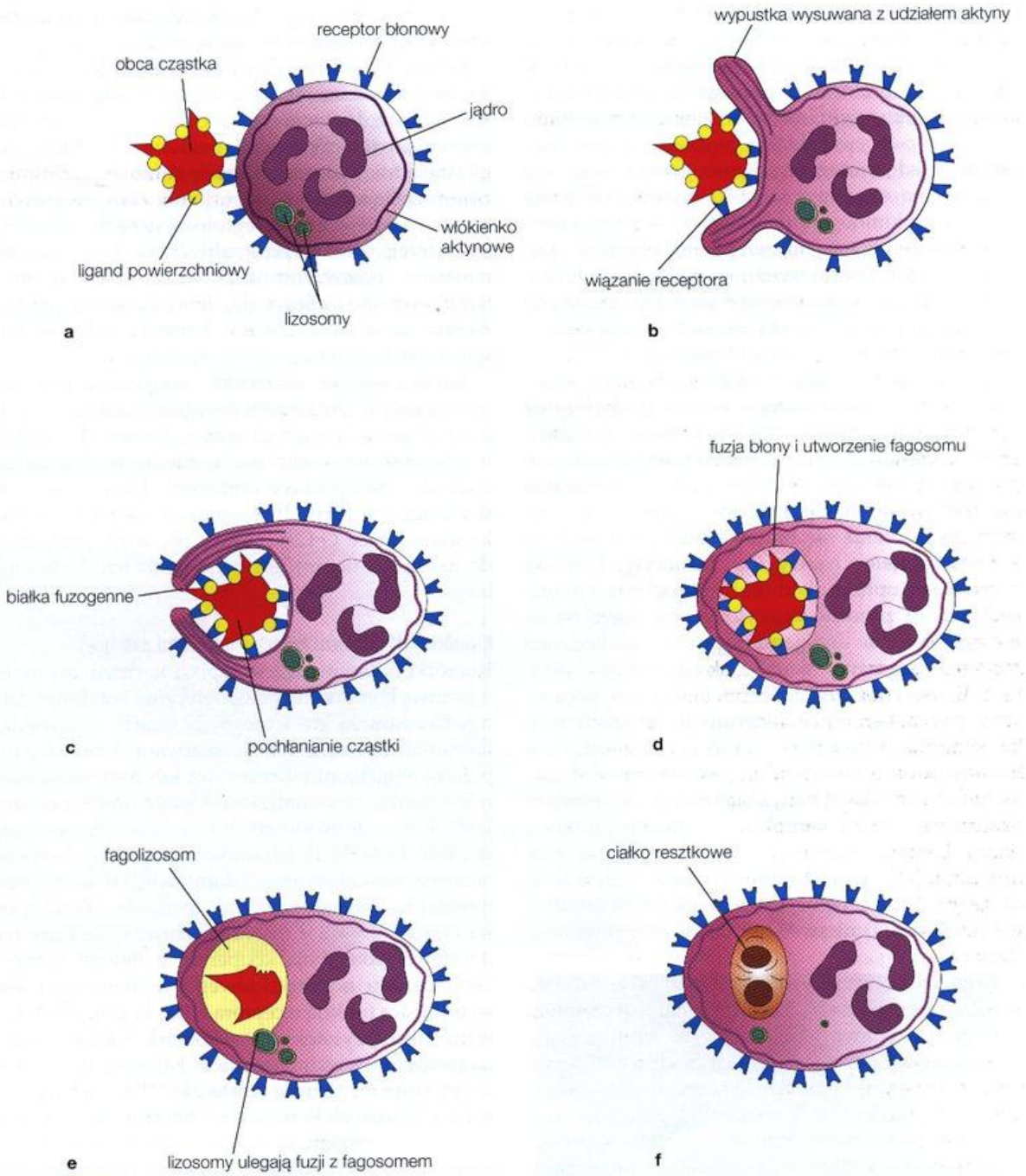
Do komórek biorących udział w odpowiedzi immunologicznej, czyli komórek immunokompetentnych, zalicza się limfocyty (T, B), fagocyty oraz komórki prezentujące antygeny. W poniższej części rozdziału omówiono komórki biorące udział w odporności nieswoistej. Funkcja poszczególnych subpopulacji limfocytów została omówiona w dalszej części.

Fagocyty (neutrofile, makrofagi)

Makrofagi oraz granulocyty obojętnochłonne biorą aktywny udział w inicjowaniu, a w konsekwencji w przebiegu reakcji immunologicznych. Populacje tych komórek pochodzą z komórek macierzystej linii szpikowej powstałej z ukierunkowanych komórek prekursorowych hemopoetycznych (tzw. komórki progenitorowe hemopoetyczne).

Granulocyty obojętnochłonne (**neutrofile**) są najliczniej reprezentowaną formą morfologiczną leukocytów. Znaczna ich liczba występuje w tkance łącznej, a tylko nieliczne w strumieniu krwi. Podstawową funkcją neutrofili jest udział w inicjacji procesu zapalnego i fagocytoza drobnoustrojów, zwłaszcza bakteryjnych. Aktywacja komórek następuje w wyniku zakażenia lub uszkodzenia tkanki. W odpowiedzi na miejscowo wydzielane cytokiny (interleukiny – IL) neutrofile opuszczają krwiobieg (diapedeza), reagują na czynniki chemotaktyczne – chemotaksyny (produkty metabolizmu bakterii, mediatory uwalniane przez inne komórki układu immunologicznego, składniki dopełniacza), co ułatwia im migrację do miejsca odpowiedzi zapalnej. Na powierzchni ich błony komórkowej znajdują się receptory dla fragmentu Fc przeciwciała opłaszczającego antygen oraz składników C dopełniacza połączonych z obcymi cząsteczkami, np. polisacharydami bakteryjnymi. Proces fagocytozy zachodzący w neutrofilach przedstawiono na rycinie 12.2.

Neutrofile zabijają drobnoustroje nie tylko z udziałem wydzielanych enzymów, ale także poprzez tworzenie aktywnych form tlenu (nadtlenek wodoru, kwas podchlorawy, rodniki hydroksylowe). Niezależnie od tlenu działają defenzyny – białka kationowe, lizozym rozpuszczający otoczki bakteryjne, laktoferyna wiążąca żelazo niezbędne do prawidłowego funkcjonowania bakterii. Aktywowane neutrofile syntetyzują i uwalniają do środowiska szereg substancji biologicznie czynnych,



Rycina 12.2 Proces fagocytozy neutrofilów: **a**. Granulocyty obojętnochłonne mają receptory błonowe dla fragmentu Fc immunoglobulin, a także składników dopełniacza wiążących polisacharydy otoczek bakteryjnych (ligand powierzchniowy). Neutrofile nie potrafią sfagocytować cząstek, z którymi nie są związane. **b**. Receptory błonowe neutrofilu tworzą połączenie z usuwaną cząsteczką. Komórka w wyniku reorganizacji cytoszkieletu (głównie filamentów aktynowych) wytwarza wypustki (pseudopodia), które otaczają fagocytowaną cząstkę. **c**. Pseudopodia otaczają usuwaną cząstkę i z udziałem białek fuzogennych tworzą pęcherzyk endocytarny. **d**. Pęcherzyk endocytarny wraz z fagocytowaną cząstką tworzy fagosom. **e**. Ziarenka pierwotne (lizosomy) neutrofilu uwalniają swoją zawartość i sfagocytowany materiał poddany jest działaniu aktywnej mieszaniny enzymów lizosomalnych. W przypadku sfagocytowanych antygenów bakteryjnych w ich eliminacji dodatkowo współdziałają nadtlenek wodoru i anion nadtlenkowy powstający w czasie redukcji tlenu.
f. W cytoplazmie neutrofilu są widoczne ciałka resztkowe zawierające zdegradowany materiał.

np. leukotrieny – pochodne kwasu arachidonowego, działające jako mediatory stanu zapalnego (rozszerzają naczynia krwionośne, zwiększając ich przepuszczalność, wpływają chemotaktycznie na inne leukocyty). Istotną rolę w kontroli stanu zapalnego odgrywają białka osocza krwi, tzw. osoczowy układ kininogenny. Kininogenazy osoczowe – kalikreina osoczowa oraz kalikreiny tkankowe uwalniają z kininogenów biologicznie czynne peptydy, które wpływają na zwiększenie przepuszczalności naczyń włosowatych, pobudzenie migracji leukocytów, w wyniku czego powstają klasyczne objawy reakcji zapalnej – miejscowy obrzęk, zaczerwienienie i ból (zob. rozdział *Śródbłonek*).

Makrofagi powstają z monocytów krwi, które opuszczając łożysko naczyń włosowatych i żyłek zawłosowatych, przechodzą do okolicznych tkanek i tu przekształcają się w komórki o właściwościach żernych. W zależności od miejsca ich występowania (tkanka łączna, układ nerwowy, kości, wątroba) komórki te różnią się budową oraz czynnościami i noszą specjalne nazwy (np. histiocyty, komórki Borowicza-Kupffera, komórki mikrogleju). Uczestniczą one w procesie fagocytozy, polegającej na fazie rozpoznania antygenu (bakterie, uszkodzone komórki, fragmenty tkanek), pochłaniania i ostatecznie jego zniszczenia. Proces fagocytozy poprzedza chemotaksja, czyli ukierunkowany ruch tych komórek do miejsca infekcji. Precyzyjne poruszanie się makrofagów w tkankach jest ułatwione dzięki temu, że komórki syntetyzują kolagenazę, elastazę i hialuronidazę i w konsekwencji trawią substancję międzykomórkową tkanki łącznej; w ten sposób biorą także udział w przebudowie tkanek i regeneracji. Makrofagi mogą fagocytować wykorzystując dwa mechanizmy: (1) nieswoisty i (2) swoisty (immunofagocytoza).

Fagocytoza nieswoista zachodzi bez udziału przeciwciał i polega na działaniu bogatego zestawu szeregu enzymów lizosomalnych, wytwarzaniu nadtlenku wodoru i wolnych rodników, które uszkadzają błonę komórkową fagocytowanych nieprawidłowych komórek i bakterii.

Fagocytoza swoista (immunofagocytoza) polega na opsonizacji (opłaszczaniu) bakterii lub nieprawidłowych komórek przeciwciałami. Kompleks antygen–przeciwciało wiązany jest fragmentem Fc przeciwciał z odpowiednim receptorem znajdującym się na powierzchni błony fagocytów. Receptory dla fragmentów Fc przeciwciał nie tylko wiążą kompleks antygen-przeciwciało, ale także aktywują komórki do cytotoksyczności zależnej od przeciwciał (tzw. **reakcja ADCC** – *antigen dependent cell cytotoxicity*). Jest ona skierowana przeciw komórkom, które wcześniej związały przeciwciało.

Oprócz receptorów Fc, na powierzchni makrofagów obecne są także receptory C dla pewnych składników dopełniacza oraz receptory rozpoznające węglowodany otoczek bakteryjnych. Makrofagi fagocytują bakterie, niszczą komórki zmienione transformacją nowotworową lub zakażone wirusem na drodze efektu cytotoksycznego. Wydzielają szereg cytokin pozapalnych (w tym czynnik martwicy nowotworów **TNFα** – *tumor necrosis factor*, proteinę o silnym działaniu cytotoksycznym, zwłaszcza w stosunku do komórek nowotworowych) i o działaniu przeciwzapalnym.

Uważa się, że makrofagi odgrywają również istotną rolę w prezentacji antygenów egzogennych pochodzących z dużych sfagocytowanych cząstek lub bakterii (do czego nie są zdolne profesjonalne komórki prezentujące antygen) limfocytom Th w kontekście MHC II. Uwalniają również czynniki stymulujące G-CSF i GM-CSF, które prowadzą do aktywacji neutrofili i uwalniania ich do krwiobiegu.

Komórki NK (*natural killers* – naturalni zabójcy)

Komórki NK powstają w szpiku kostnym z progenitorowej komórki hematopoetycznej linii limfoidalnej. Uczestniczą we wczesnych fazach odpowiedzi immunologicznej. Tworzą pierwszą linię obrony przed patogenami wirusowymi lub bakteriami rozwijającymi się wewnątrzkomórkowo oraz własnymi zmienionymi nowotworowo komórkami bez ekspresji MHC I i MHC II. Ich unikalna zdolność do spontanicznej cytotoksyczności docelowych komórek bez uprzedniej immunizacji (tym różnią się od większości limfocytów B i T, które do zniszczenia komórki docelowej potrzebują kooperacji z innymi komórkami układu odpornościowego) wspomagana jest stymulującą funkcją receptora NKR. W celu kontrolowania funkcji cytotoksycznej komórki NK prezentują na swojej powierzchni receptory KIR (hamujące zabijanie), które rozpoznają cząsteczki MHC i własne antygeny zdrowych komórek i w ten sposób chronią je przed zniszczeniem. Jednak komórki nowotworowe, które zachowały MHC I i zdolność prezentowania własnych antygenów, nie są niszczone w efekcie cytotoksycznym, co w konsekwencji prowadzi do rozwoju nowotworu. Inną cząsteczką związaną z błoną komórek NK jest antygen powierzchniowy – CD16, stanowiący receptor dla fragmentu Fc przeciwciał klasy IgG. W ten sposób powstaje sygnał do zabicia komórki docelowej. Zjawisko to znane jest jako cytotoksyczność zależna od przeciwciał (reakcja ADCC).

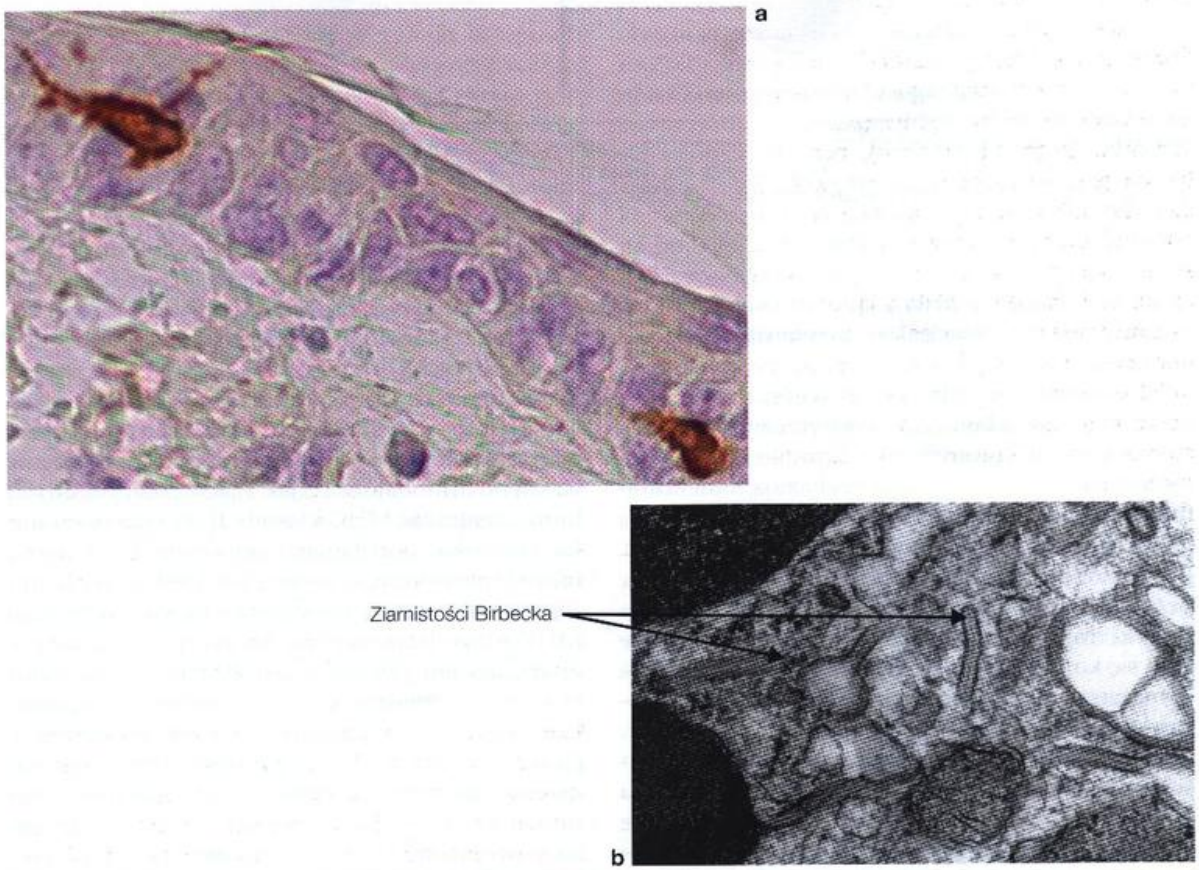
Komórki prezentujące antygen, dendrytyczne

Wśród komórek profesjonalnie prezentujących antygen (APCs) zasadniczą rolę odgrywają **komórki dendrytyczne**, które są pochodzenia szpikowego. Tworzą dwie subpopulacje różnicujące się z macierzystej komórki hemopoetycznej: (1) **z komórki macierzystej mielopoezy (monocyt – komórka dendrytyczna)** oraz (2) z **progenitorowej komórki limfopoezy**. Obie subpopulacje komórkowe różnią się między sobą ilością i jakością wydzielanych czynników. Komórki linii limfoidalnej wydzielają duże ilości interferonu (IFN α i ß), natomiast komórki linii mieloidalnej wydzielają w dużych ilościach interleukinę IL-12, która indukuje dojrzewanie limfocytów Th. Mimo ubogiego zestawu enzymów lizosomalnych, charakteryzują się dużą aktywnością endocytarną, co różni je od innych komórek wyspecjalizowanych w procesie fagocytozy.

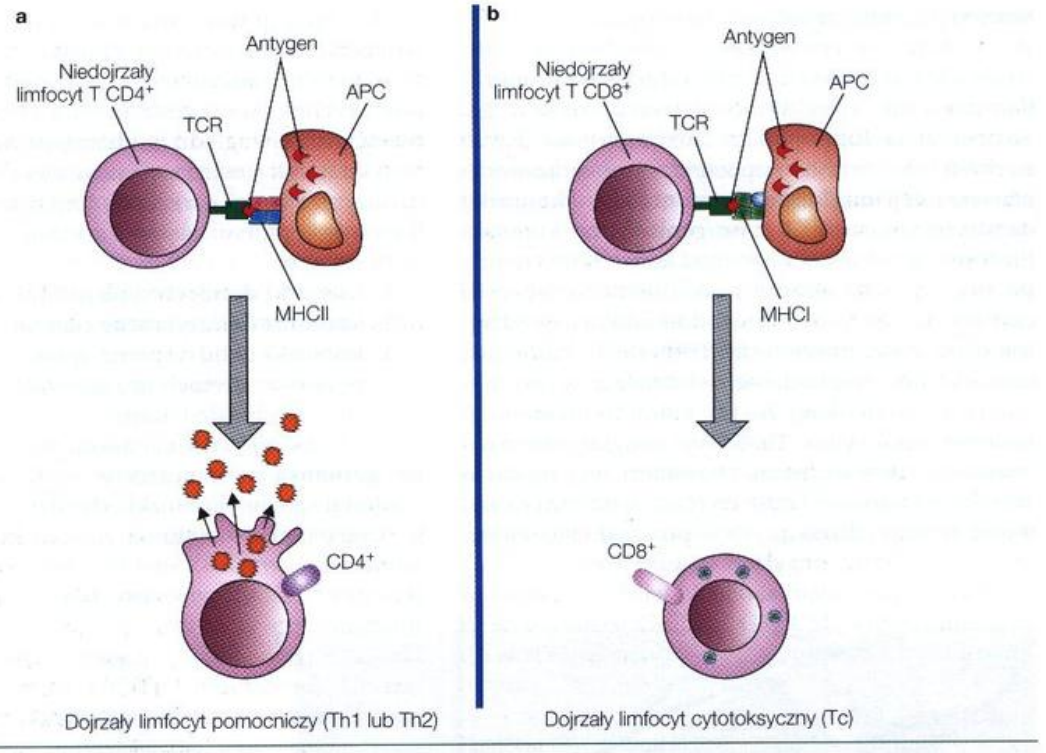
Cechą charakterystyczną komórek prezentujących antygen są rozgałęzione wypustki cytoplazmatyczne, przypominające dendryty, istotnie zwiększające powierzchnię kontaktu z innymi komórkami i antygenami. Ze względu na charakterystyczny kształt tych komórek stosuje się nazwę opisową – komórki dendrytyczne. W narządach limfatycznych morfologicznie wyróżnia się trzy rodzaje komórek dendrytycznych:

1. **komórki dendrytyczne grudek chłonnych;**
2. **komórki dendrytyczne rdzenia grasicy;**
3. **komórki dendrytyczne splatające się**, występujące w strefach grasiczozależnych węzłów chłonnych i śledziony.

Do komórek APCs należą również **komórki Langerhansa** występujące w naskórku (fot. 12.1), śródmiąższowe komórki dendrytyczne obecne w tkance łącznej wielu narządów, **komórki welo-**



Fot 12.1 a. Mikrofotografia skrawka skóry barwiona immunocytochemicznie za pomocą przeciwciał wykrywających komórki Langerhansa w naskórku. **b.** Elektronogram fragmentu komórki Langerhansa. Na dużym powiększeniu widoczne typowe cytoplazmatyczne struktury tej komórki – ziarnistości Birbecka. Są to pałeczkowate twory, których jeden koniec rozszerza się w pęcherzyk, przez co przypomina rakietę tenisową. (Elektronogram dzięki uprzejmości dr Barbary Krajewskiej).



Rycina 12.3 Sposoby wychwytywania i prezentacji antygenu przez komórki prezentujące antygen (APCs). **a.** Antygeny egzogenne prezentowane są wraz z cząsteczkami MHC klasy II zawsze limfocytom pomocniczym Th (CD4). **b.** Antygeny endogenne prezentowane są wraz z cząsteczkami MHC klasy I zawsze limfocytom cytotoksycznym Tc (CD8).

nowate krążące we krwi i chłonce oraz **komórki mikrogleju** obecne w ośrodkowym układzie nerwowym.

W każdym z wymienionych wyżej miejsc, właściwości i funkcja komórek dendrytycznych są inne. Komórki dendrytyczne zlokalizowane w tkankach (określane jako niedojrzałe) wykazują silne zdolności do endocytozy antygenów zarówno obcych, jak i własnych pochodzących z rozpadu komórek. Endocytoza i przetworzenie antygenu na małe peptydy mobilizują komórki dendrytyczne do wędrówki do regionalnych węzłów chłonnych, gdzie stają się komórkami w pełni dojrzałymi – zdolnymi do prezentacji antygenu i produkcji cytokin prozapalnych.

Komórki APCs jako pierwsze mają kontakt z antygenem i po odpowiednim jego przetworzeniu prezentują limfocytom T struktury antygenowe – determinanty antygenowe (zob. niżej). Na powierzchni błony komórkowej wykazują obecność cząsteczek MHC klasy I i II. W komórkach dendrytycznych cząsteczki MHC klasy I mogą uczestniczyć w prezentacji antygenów egzogennych (pochodzących ze sfagocytowanych komórek, np. komórek zakażonych wirusem lub komórek nowotworowych) limfocytom Tc (cytotoksycznym). Prowadzi to do eliminacji komórek zmienionych. Ten sposób prezentacji antygenu nazywamy **prezentacją krzyżową**. Umożliwia ona pobudzenie zarówno limfocytów Tc, jak i Th, w którym udział biorą cząsteczki MHC klasy I i II. W tym przypadku komórka, pochłaniając antygeny z zewnątrz, może je prezentować z udziałem MHC klasy II limfocytom Th, a także (co jest nietypowe) z udziałem MHC klasy I limfocytom Tc. Limfocyt Tc rozpoznaje antygen związany z MHC I, ale nie eliminuje komórki dendrytycznej prezentującej antygen. Limfocyty Th wydzielają cytokiny pobudzające (IL-1) limfocyty Tc, powodując tym samym mocniejszą ich aktywację. Tak zaktywowane limfocyty Tc sprawdzają obecność antygenów na powierzchni innych komórek i w razie potrzeby mogą niszczyć je poprzez wywieranie efektu cytotoksycznego.

Mechanizmy odporności nabytej (swoistej)

Odporność nabyta (swoista) uwarunkowana jest obecnością limfocytów i przeciwciał wykazujących zdolność do precyzyjnego rozpoznawania antygenów. Cechami, które charakteryzują odporność nabytą, są: 1. **specyficzność** będąca konsekwencją procesu określanego mianem selekcji klonalnej, 2. **pamięć immunologiczna**, warunkująca szybszą odpowiedź na powtórne zetknięcie organizmu z danym antygenem, 3. **różnorodność**, która wynika z procesu rekombinacji zarówno genów immunoglobulinowych, jak i genów dla receptorów limfocytów T, 4. **zdolność do samoograniczania** – neutralizacja antygenu, który wygenerował specyficzną odpowiedź immunologiczną, prowadzi do jej wygaśnięcia, 5. **tolerancja** – zdolność do rozróżniania antygenów własnych i obcych. Wyróżnia się: 1. odporność nabytą czynnie w sposób naturalny – poprzez aktywną odpowiedź immunologiczną na dany antygen, 2. odporność nabytą czynnie w sposób sztuczny poprzez szczepionki, 3. odporność nabytą biernie w sposób naturalny – w okresie płodowym lub z mlekiem matki, 4. odporność nabytą biernie w sposób sztuczny dzięki surowicy odpornościowej.

Rozwój jakiejkolwiek odpowiedzi immunologicznej wymaga ścisłej kooperacji wielu komórek układu immunologicznego, dlatego też restrykcyjne wyodrębnienie populacji komórek przypisanych do odpowiedzi nabytej nie jest możliwe. Podstawowymi komponentami komórkowymi odpowiedzi nabytej są niewątpliwie limfocyty T oraz limfocyty B, które różnicują się do komórek plazmatycznych produkujących przeciwciała. Trudno jednak nie wspomnieć o komórkach APC (zaliczanych do odporności nieswoistej), bez których uruchomienie mechanizmów odpornościowych z udziałem limfocytów T nie byłoby możliwe. Dlatego też warto pamiętać, iż zrozumienie mechanizmów odpowiedzi immunologicznej wymaga spojrzenia globalnego, a istniejące podziały należy traktować jedynie jako formę usystematyzowania wiedzy, a nie wyznaczenia restrykcyjnych granic.

Odporność nabyta obejmuje dwa typy odpowiedzi na antygen. Pierwszy, w którym pośredniczą przeciwciała wytwarzane przez komórki plazmatyczne – końcowe stadium różnicowania limfocytów B, zwany jest **odpowiedzią typu humoralnego**. Odpowiedź ta skierowana jest przeciw antygenowi znajdującemu się poza komórką lub związanemu z jej powierzchnią. Związanie przeciwciała z antygenem lub toksyną wytwarzaną przez patogen może przyczynić się do wzmocnienia aktywności fagocytarnej makrofagów oraz rekrutacji leukocytów i komórek tucznych do produkcji i wydzielania cytokin i mediatorów, co w konsekwencji prowadzi do wzmocnienia odpowiedzi immunologicznej. Wynikiem odpowiedzi typu humoralnego jest produkcja przeciwciał i limfocytów B pamięci. Drugi typ odpowiedzi immunologicznej – odpowiedź komórkowa charakteryzuje się tym, że z antygenem reagują bezpośrednio komórki – limfocyty T. Reakcja na antygen wymaga odpowiedniego przetworzenia antygenu i jego prezentacji przez wyspecjalizowane cząsteczki – MHC I i/lub MHC II.

Odpowiedź komórkowa

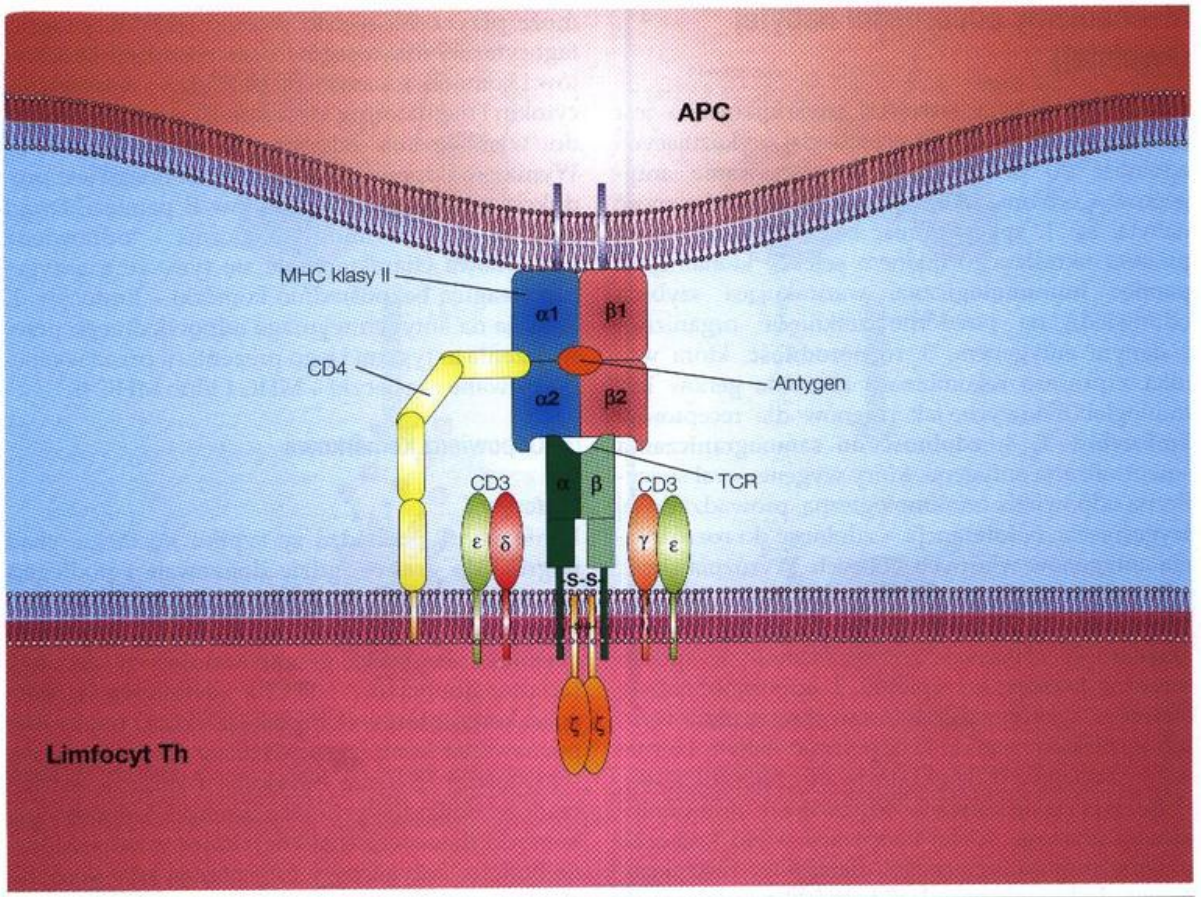
Limfocyty T

Limfocyty T pochodzą ze szpiku kostnego, skąd migrują do grasicy, gdzie dojrzewają i podlegają procesom różnicowania do komórek immunokompetentnych – dojrzałych limfocytów T. Procesy te obejmują rearanżację genów kodujących białkowy receptor limfocytów T (TCR), zdefiniowanie obecności koreceptorów (CD8 lub CD4) oraz naukę rozpoznawania kompleksu MHC ze ściśle określoną swoistością. Dojrzałe limfocyty T migrują do narządów obwodowych jako immunokompetentne komórki dziewicze (naiwne), które w odpowiedzi na bodziec antygenowy funkcjonują jako komórki efektorowe/pamięci.

Kompleks receptorowy limfocytów T

Kompleks receptorowy limfocytów T składa się z receptora limfocytu T (TCR – *T cell receptor*) dla antygenu i kompleksu CD3. Wskutek stymulacji antygenowej kompleks ten inicjuje serię procesów biochemicznych w limfocycie T prowadzących do zmiany stanu aktywności komórki. Receptor TCR, służący do swoistego rozpoznawania antygenów, jest regionem polimorficznym kompleksu, natomiast CD3, który pośredniczy w transdukcji sygnału aktywującego limfocyt, jest regionem wysoce zachowawczym.

Receptory TCR są to białkowe heterodimery dwóch łańcuchów polipeptydowych połączonych mostkiem dwusiarczkowym, występujące na powierzchni limfocytów T. Szczegółową budowę receptora zilustrowano na rycinie 12.4. Istnieją dwa główne rodzaje TCR: receptory składające się z łańcuchów α i β (ponad 90% obwodowych limfocytów T), oraz receptory zbudowane z łańcuchów γ i δ. Budowa genów TCR warunkuje możliwość zaistnienia u człowieka wielkiej różnorodności białek

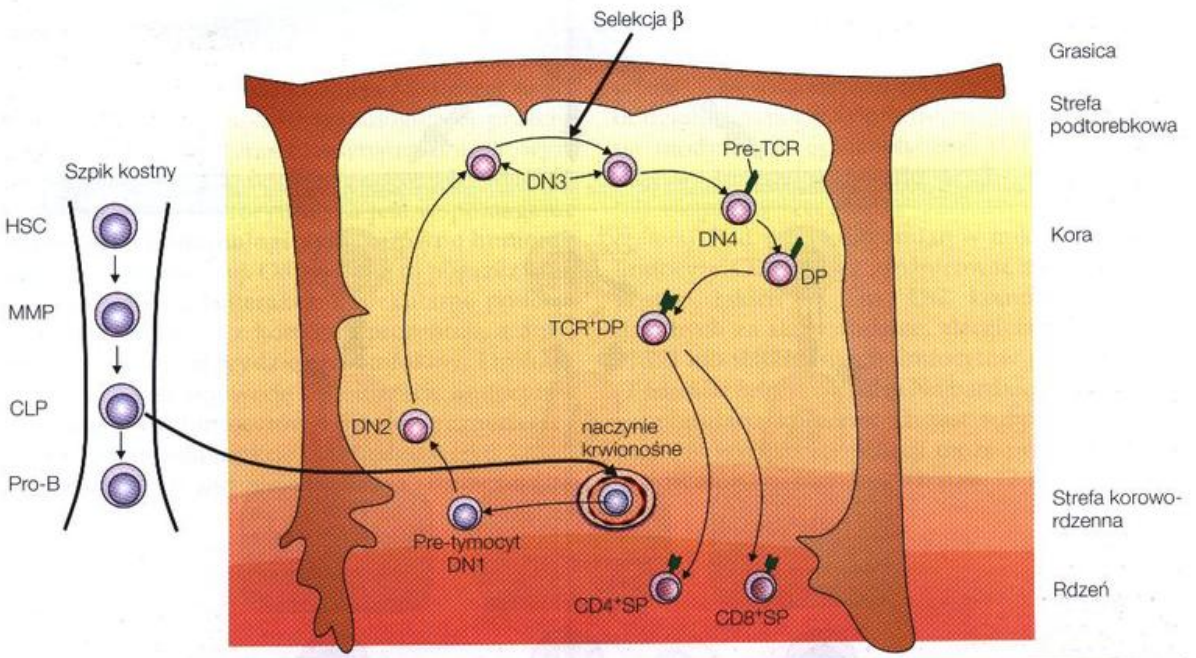


Rycina 12.4 Schemat budowy kompleksu receptorowego limfocytu Thαβ. Kompleks receptorowy zbudowany jest z receptora limfocytu T (TCR) oraz kompleksu CD3. Domena zewnątrzkomórkowa TCR składa się z łańcucha α, który połączony jest wiązaniem dwusiarczkowym z łańcuchem β. Oba łańcuchy mają domenę przezbłonową oraz krótki fragment cytoplazmatyczny. Receptory TCR są związane z kompleksem CD3, zbudowanym z kilku łańcuchów polipeptydowych (łańcucha gamma (γ), łańcucha delta (δ), dwóch łańcuchów epsilon (ε) i dwóch łańcuchów dzeta (ζ). Cząsteczka CD4 jest koreceptorem i wiąże się bezpośrednio z cząsteczką MHC klasy II obecną na powierzchni komórek APC.

TCR, co jest niezbędne ze względu na funkcję, jaką pełnią. Proces kodowania białek TCR nie jest tak prosty, jak w większości przypadków, gdzie jeden gen koduje jedno białko. Geny kodujące łańcuchy receptora TCR są zbiorami wielu fragmentów genu, z których dopiero po wielu przekształceniach powstaje właściwy gen. Proces rekombinacji somatycznej genów kodujących TCR, polegający na zmiennym przemieszczaniu i delecji sekwencji DNA, nazywany jest rearanżacją *locus* TCR. Proces rearanżacji genów TCR odbywa się we wczesnej fazie dojrzewania tymocytów w grasicy.

Stadia różnicowania tymocytów

Komórki progenitorowe limfocytów T pochodzą ze szpiku kostnego, a następnie migrują do grasicy, gdzie jako tymocyty zasiedlają ją w strefie korowo-rdzennej. Na tym etapie różnicowania tymocyty nie wykazują ekspresji koreceptorów CD8 i CD4, stąd określa się je mianem tymocytów podwójnie negatywnych (DN). Po przejściu procesu selekcji β (dopuszczającej do dalszego różnicowania komórki z prawidłową strukturą receptora TCR) tymocyty intensywnie proliferują i różnicują się do komórek $CD4^+CD8^+$, które są nazywane podwójnie pozytywnymi (DP, ryc. 12.5). Komórki te zostają w kolejnym etapie poddane procesom selekcji pozytywnej i selekcji negatywnej. Pierwszy z wymienionych procesów odbywa się w korze grasicy i jest kontrolowany przez subpopulację komórek nabłonkowych kory narządu. **Selekcja pozytywna** do dalszego różnicowania dopuszcza tymocyty mające użyteczny

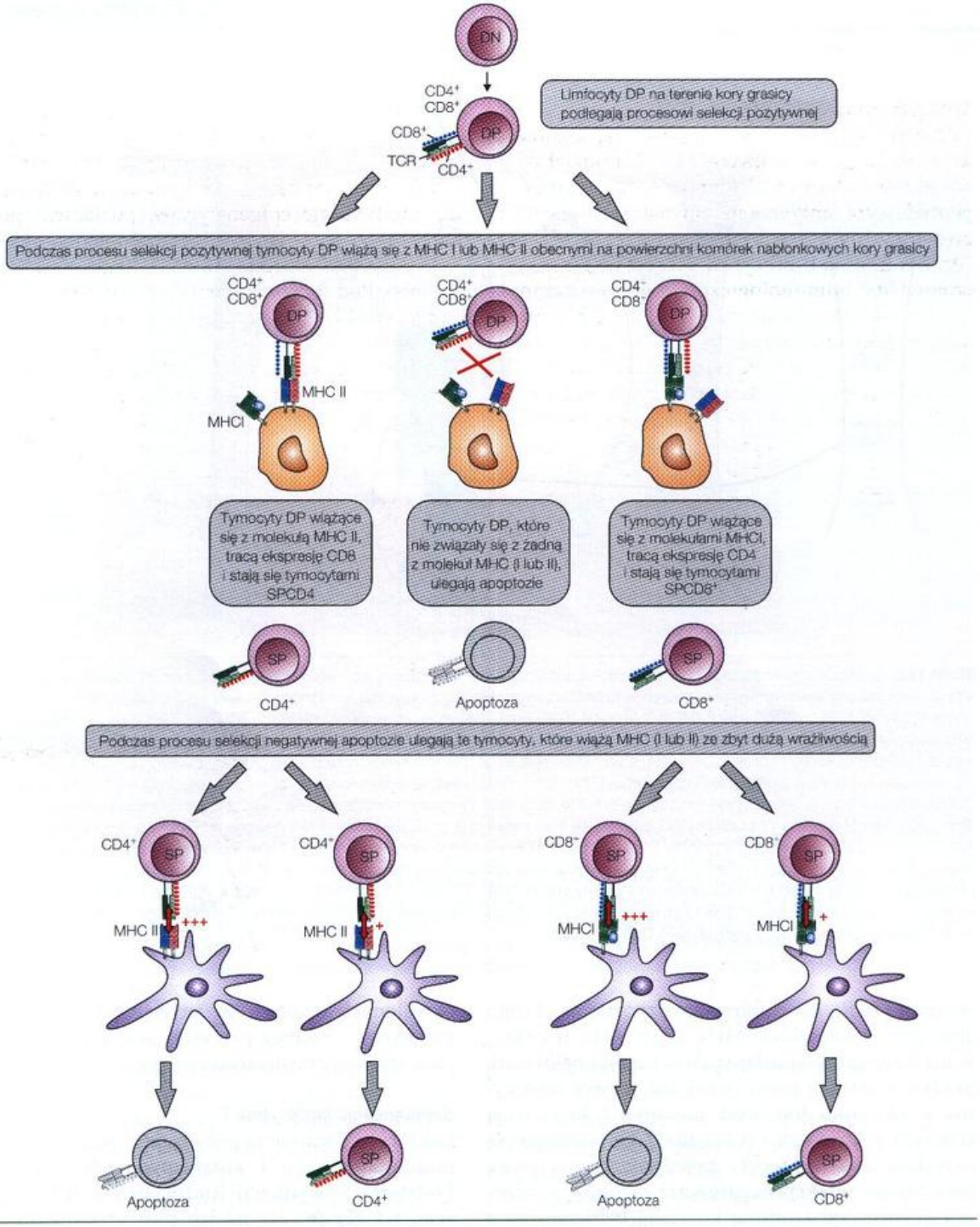


Rycina 12.5 Różnicowanie limfocytów T. Prawa strona schematu ilustruje obszary architektoniczne pseudopłacika dojrzałej grasicy, lewa – poszczególne etapy różnicowania komórek w szpiku kostnym. Hematopoetyczne komórki prekursorowe (HSCs) różnicują się w szpiku do multipotencjalych progenitorów (MMPs), z których to powstają wspólne progenitory limfoidalne (CLPs). CLPs migrują drogą naczyń krwionośnych do grasicy i jako pretymocyty zasiedlają narząd w strefie korowo-rdzennej. Na tym etapie różnicowania pretymocyty nie wykazują ekspresji koreceptorów CD8 i CD4, stąd też określa się je mianem tymocytów podwójnie negatywnych (DN). Kolejne stadia różnicowania tymocytów podwójnie negatywnych (DN1, DN2, DN3, DN4) wyodrębnia się na podstawie ekspresji markerów CD44 i CD25. Zwraca uwagę, że przejście tymocytów przez kolejne stadia zróżnicowania jest ściśle związane z lokalizacją komórek w określonym przedziale grasicy. W stadium DN3 odbywa się tzw. selekcja β, podczas której podejmowana jest decyzja o dalszym różnicowaniu tymocytu albo w kierunku limfocytu T z receptorem TCR γδ, albo w kierunku limfocytu T z receptorem αβ. Po przejściu procesu selekcji β tymocyty wchodzą w stadium DN4 i są wyposażone w niedojrzały receptor pre-TCR. W kolejnym etapie tymocyty intensywnie proliferują i różnicują się do komórek podwójnie pozytywnych $CD4^+CD8^+$(DP). W tym stadium receptor TCR jest już dojrzałym białkiem. Kolejny etap dojrzewania tymocytów to procesy selekcji pozytywnej i negatywnej, w wyniku których tymocyty zostają zdeterminowane do komórek pojedynczo pozytywnych (SP) $CD4^+$ lub $CD8^+$.

receptor (TCR), tzn. zdolny do rozpoznania obcego antygenu w kontekście MHC I lub MHC II i aktywacji wewnątrzkomórkowych białek sygnałowych. Skutkiem selekcji pozytywnej jest rozwój tymocytów w kierunku dojrzałych komórek T, które mają tylko jeden koreceptor (CD4 albo CD8) i dlatego są określane jako tymocyty pojedynczo pozytywne (SP). Proces **selekcji negatywnej** zachodzi w rdzeniu grasicy pod kontrolą komórek nabłonkowych rdzenia oraz komórek dendrytycznych. Wynikiem selekcji negatywnej jest eliminacja potencjalnie autoreaktywnych limfocytów T czyli tych, które rozpoznają antygeny własne, narządowo-swoiste. Eliminacja nieprawidłowo funkcjonujących tymocytów odbywa się drogą apoptozy. W pełni zróżnicowane do postaci immunokompetentnych limfocytów T, komórki opuszczają grasicę i zasiedlają obwodowe narządy limfatyczne w ściśle określonych rejonach, zwanych strefami grasiczozależnymi. Przebieg procesów selekcji pozytywnej i negatywnej zilustrowano na rycinie 12.6.

Subpopulacje limfocytów T

Limfocyty T stanowią populację o niejednorodnym immunofenotypie **i zróżnicowanych funkcjach. Podstawą klasyfikacji limfocytów T jest najczęściej występowanie na ich powierzchni różnych typów** receptorów TCR (TCRαβ i TCRγδ) oraz receptorów różnicowania (CD4, CD8). Obecny stan wiedzy i możliwości wykorzystania zaawansowanych technik badawczych pozwalają na wzbogacenie kryteriów klasyfikacji populacji limfocytów T o kolejne, charakterystyczne markery oraz wydzielane przez nie substancje, a co za tym idzie – pełnione przez nie funkcje.

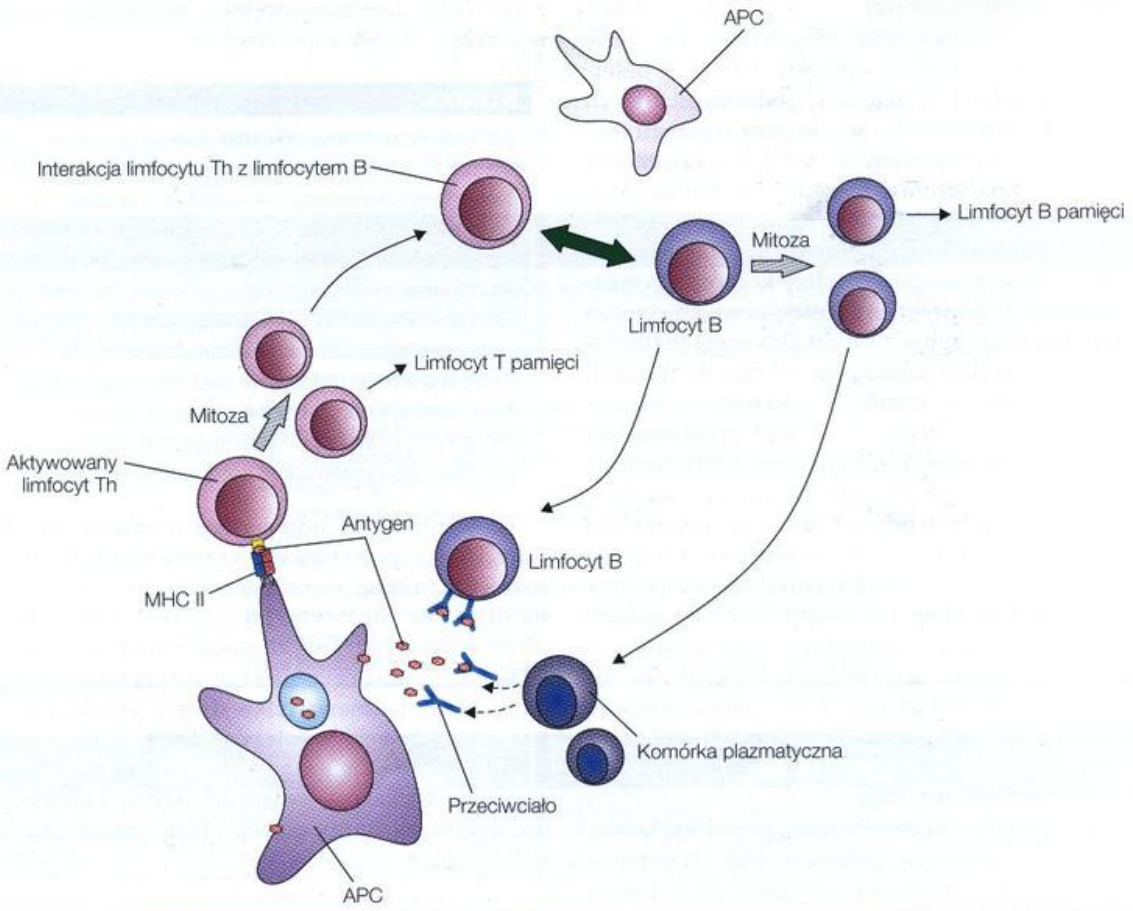


Rycina 12.6 Schemat ilustrujący przebieg procesów selekcji pozytywnej i negatywnej tymocytów. Tymocyty podwójnie pozytywne (DP), czyli takie, które mają dojrzały receptor TCR oraz wykazują ekspresję CD4 i CD8, podlegają procesowi selekcji pozytywnej. Odbywa się ona na terenie kory grasicy pod kontrolą komórek nabłonkowych. Komórki nabłonkowe mają na swojej powierzchni zarówno MHC I, jak i MHC II, co daje możliwość weryfikacji prawidłowego rozpoznania obu tych molekuł przez receptor dojrzewających tymocytów. Tymocyt, którego TCR związał się z molekułą MHC II, traci ekspresję cząsteczki CD8 i będzie odtąd określany jako pojedynczo pozytywny $CD4^+$. Analogicznie – tymocyt, którego TCR związał się z molekułą MHC I, traci ekspresję cząsteczki CD4 i staje się tymocytem $CD8^+$. Tymocyty, których receptor nie związał się z żadną z molekuł MHC, ulegają apoptozie i nie zostają dopuszczone do kolejnego etapu różnicowania – selekcji negatywnej. Proces selekcji negatywnej zachodzi w rdzeniu grasicy pod kontrolą komórek nabłonkowych rdzenia oraz komórek dendrytycznych. Wynikiem selekcji negatywnej jest eliminacja tymocytów, które wiążą molekuły MHC zbyt silnie i mogą stanowić potencjalne źródło limfocytów T autoreaktywnych. Eliminacja tymocytów wiążących MHC ze zbyt dużą swoistością odbywa się drogą apoptozy.

Limfocyty pomocnicze (Th)

Są populacją limfocytów T wyposażoną w koreceptor CD4, czego konsekwencją jest ich udział w generowaniu odpowiedzi immunologicznej przeciw peptydowym antygenom zewnątrzkomórkowym prezentowanym z udziałem cząsteczek MHC II. Główną funkcją **limfocytów Th jest wspomaganie odpowiedzi immunologicznej, zarówno humoralnej**, jak i komórkowej. Odbywa się to poprzez kontakt bezpośredni (interakcje molekularne podczas kontaktu limfocytu z komórką prezentującą antygen), jak i poprzez wydzielane limfokiny. Limfocyty Th ułatwiają aktywację i proliferację limfocytów B, prekursorów limfocytów T cytotoksycznych (Tc), a także pobudzają funkcje makrofagów (ryc. 12. 7).

Populacja Th jest niejednorodna. Poszczególne subpopulacje różnią się wieloma cechami, w tym: wrażliwością na obecność cytokin w mikrośrodowisku, wewnątrzcytoplazmatycznymi białkami oddziałującymi z komórkowym DNA, podatnością na modyfikacje epigenetyczne, poziomem pobudzenia, prowadzącym do wydzielania cytokin, lub ekspresją receptorów zasiedlania (*homing receptors*). Pod wpływem zmian w mikrośrodowisku limfocyty $CD4^+$ mogą zróżnicować się do różnych postaci, takich jak Th1, Th2, komórek odpowiedzialnych za stany zapalne, alergiczne (Th9, Th17, Th22) lub folikularnych limfocytów pomocniczych (*T folicular helper cell*, Tfh). Najbardziej „plastyczną" subpopulacją komórek Th jest subpopulacja Th0, która w wyniku stymulacji może przekształcić się w dowolny typ komórek Th (tab. 12.1).



Rycina 12.7 Rola limfocytów T pomocniczych w regulacji odpowiedzi immunologicznej. Prezentacja antygenu przez komórkę APC prowadzi do aktywacji limfocytu Th, czego konsekwencją jest intensywna proliferacja limfocytów. Interakcja limfocytu Th z limfocytem B w obecności komórki APC prowadzi do wzrostu aktywności mitotycznej limfocytów B, które mogą uczestniczyć w szybkim neutralizowaniu wolnych antygenów, różnicować się do komórek plazmatycznych wydzielających przeciwciała lub stać się limfocytami B pamięci.

Tabela 12.1 Funkcje subpopulacji limfocytów Th

LIMFOCYTY POMOCNICZE Th	
Subpopulacja	Funkcja
Th0	zdolność do różnicowania się w dowolny typ komórki efektorowej
Th1	wspomaganie odpowiedzi zapalnej stymulacja cytotoksyczności limfocytów aktywacja makrofagów aktywują komórki śródbłonka, co warunkuje wiązanie monocytów i ich wyjście ze światła naczynia pobudzanie limfocytów B do wytwarzania immunoglobulin udział w odporności przeciwko patogenom wewnątrzkomórkowym utrzymywanie homeostazy pomiędzy Treg a Th17
Th2	udział w odporności humoralnej wobec patogenów zewnątrzkomórkowych pobudzanie proliferacji i różnicowania limfocytów B pobudzanie limfocytów B do produkcji immunoglobulin i zmiany izotypu przeciwciał udział w infekcjach przeciwpasożytniczych oraz w chorobach alergicznych

Limfocyty cytotoksyczne (Tc)

Limfocyty cytotoksyczne wykazują ekspresję powierzchniowych koreceptorów CD8, co determinuje ich udział w reakcjach odpornościowych skierowanych przeciwko antygenom wewnątrzkomórkowym prezentowanym z udziałem cząsteczek MHC I. Ich główna rola to niszczenie komórek zakażonych przez wirusy i inne mikroorganizmy, a także niszczenie komórek nowotworowych na drodze efektu cytotoksycznego, czyli lizy komórki. Ponadto limfocyty Tc poprzez produkcję licznych cytokin i chemokin przyczyniają się do aktywacji makrofagów. Znane są dwa szlaki prowadzące do indukcji przez Tc apoptozy komórek zakażonych wirusami: 1. uwalnianie litycznych granul zawierających perforyny, granzymy i granulizyny, które wnikają do komórki docelowej, 2. interakcja cząsteczek FasL i FasR występujących odpowiednio na powierzchni Tc i powierzchni komórki docelowej (ryc. 12.8).

Podobnie jak limfocyty Th, populacja limfocytów Tc jest niejednorodna. Do grupy komórek układu immunologicznego wykazujących aktywność cytotoksyczną zalicza się: limfocyty Tc, komórki NK (*natural killer*) oraz limfocyty Tγδ. Funkcje poszczególnych komórek przedstawiono w tabeli 12.2.

Limfocyty regulatorowe (Treg)

Komórki te stanowią heterogenną populację komórek, których głównym zadaniem jest utrzymanie stanu tolerancji na własne antygeny i/lub hamowanie nadmiernej reakcji zapalnej, a tym samym zapewnienie homeostazy układu immunologicznego. Mechanizm działania komórek regulatorowych opiera się na uwalnianiu cytokin o działaniu supresorowym bądź na bezpośredniem oddziaływaniu z komórką docelową poprzez prezentację na powierzchni cząstek supresyjnych.

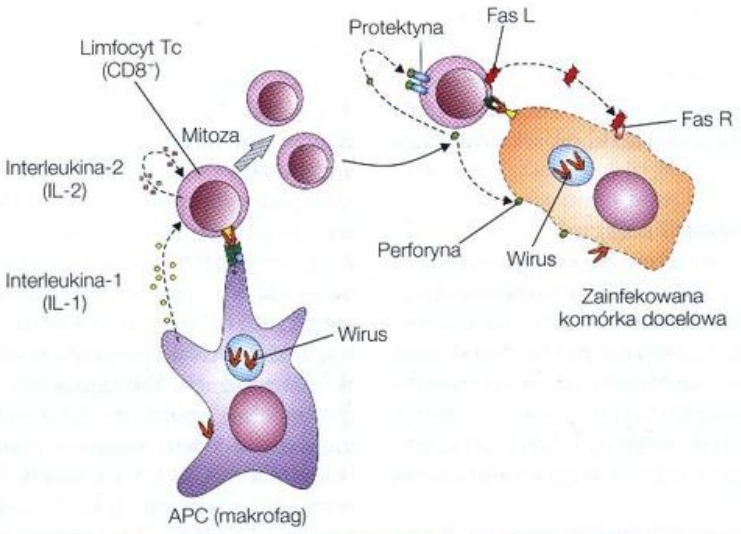
KLINIKA

Zaburzenia w funkcjonowaniu Treg mają istotne znaczenie w patogenezie chorób autoimmunologicznych, alergicznych oraz przewlekłych zakażeń. Ich nadreaktywność może być przyczyną nadmiernego wyciszenia odpowiedzi immunologicznej i prowadzić do nieprawidłowego rozpoznania własnych, zmienionych autoantygenów i w konsekwencji np. do braku skutecznej eliminacji komórek nowotworowych. Nadreaktywność limfocytów Treg może być również niepożądana podczas rozpoznawania obcych antygenów, powodując niedostateczną obronę przeciwinfekcyjną i przetrwanie patogenu w ustroju.

Ze względu na ontogenezę wyróżnia się dwa typy Treg: 1. powstające w grasicy naturalne limfocyty Treg (nTreg), oraz 2. generowane na obwodzie indukowane limfocyty Treg (iTreg). Oba wymienione wyżej typy Treg charakteryzują się ekspresją CD4, CD25, oraz czynnika transkrypcyjnego Foxp3. Dotychczas poznano tylko dwa czynniki pozwalające na identyfikację typów Treg, są to: czynnik transkrypcyjny Helios i białko neurofilina, których ekspresję wykazują wyłącznie nTreg. Funkcje poszczególnych subpopulacji Treg przedstawiono w tabeli 12.3.

Limfocyty Tγδ

Stanowią nieliczną populację krążących limfocytów T, które różnią się od wyżej wymienionych nie tylko budową receptora, ale również szlakiem różnicowania. Dojrzewają one w grasicy znacznie wcześniej niż



Rycina 12.8 Rola limfocytów T cytotoksycznych w odpowiedzi immunologicznej. Rozpoznanie antygenu prezentowanego na powierzchni komórki APC przez limfocyt Tc prowadzi do „dwutorowej" aktywacji limfocytu – drogą parakrynową (IL-1 wydzielana przez komórkę APC) oraz drogą autokrynową (limfocyt Tc wydziela IL-2). W wyniku stymulacji następuje wzrost aktywności mitotycznej limfocytów. W obecności komórki APC prezentującej patogen (wirus), limfocyty Tc wydzielają perforyny, dzięki którym dochodzi do uszkodzenia błony komórkowej zainfekowanej komórki. Aby uniknąć samozniszczenia, limfocyty Tc produkują białka błonowe – protektyny, które wiążąc perforyny zabezpieczają błonę komórkową limfocytu. Związanie ligandu Fas produkowanego przez limfocyt Tc z receptorem Fas na powierzchni zainfekowanej komórki APC prowadzi do jej apoptozy.

Tabela 12.2 Funkcje subpopulacji limfocytów Tc

LIMFOCYTY WYKAZUJĄCE CYTOTOKSYCZNOŚĆ	
Subpopulacja	**Funkcja**
Tc	rola bakterio- i wirusobójcza
NK	udział w chorobach nowotworowych, autoimmunologicznych i alergicznych udział w infekcjach bakteryjnych, wirusowych i pasożytniczych niszczenie prawidłowych komórek hematopoetycznych, ale wykazujących ekspresję allogenicznych cząsteczek głównego układu zgodności tkankowej
Tγδ	udział w reakcjach odporności lokalnej błon śluzowych rola pro- i antyzapalna udział w chorobach nowotworowych i pasożytniczych uczestniczą w zjawisku spontanicznej cytotoksyczności komórkowej zależnej od przeciwciał biorą udział w odpowiedzi na przewlekłą stymulację układu odpornościowego w procesach autoimmunologicznych, np. w reumatoidalnym zapaleniu stawów rola w powstawaniu miejscowej odporności w infekcjach wirusowych i bakteryjnych

Tabela 12.3 Funkcje subpopulacji limfocytów Treg

LIMFOCYTY REGULATOROWE Treg	
Subpopulacja	**Funkcja**
nTreg	funkcje regulacyjne i supresorowe, w tym wobec limfocytów Th1, Th2 i regulacja funkcji limfocytów B udział w patogenezie cukrzycy wydzielanie cytokin hamujących zjawisko cytotoksyczności komórek układu immunologicznego ograniczanie rozwoju odpowiedzi immunologicznej poprzez oddziaływanie na komórki prezentujące antygen
iTreg	rola supresyjna wobec komórek układu odpornościowego indukcja zjawisk immunosupresyjnych

pozostałe subpopulacje limfocytów T, a część z nich może różnicować się i podlegać nietypowej selekcji poza grasicą. Populacja Tγδ wykazuje zdolność do spontanicznej (niepodlegającej restrykcji MHC) cytotoksyczności w stosunku do komórek nowotworowych.

Limfocyty NKT (natural killer T cells)

Limfocyty NKT są subpopulacją limfocytów T wykazującą ekspresję markerów charakterystycznych zarówno dla konwencjonalnych limfocytów T, jak i komórek NK. Na swojej powierzchni mają receptory TCR, które są zdolne do rozpoznawania antygenów glikolipidowych prezentowanych przez cząsteczkę CD1d. Komórki NKT stanowią „siły szybkiego reagowania" i odgrywają istotną rolę w przebiegu infekcji, chorób nowotworowych, choroby przeszczep przeciwko gospodarzowi oraz chorób o podłożu autoimmunizacyjnym. Działanie przeciwnowotworowe komórek NKT wyraża się wywołaniem lizy komórek nowotworowych, wytwarzaniem licznych cytokin i czynników blokujących angiogenezę w guzach litych. Jeden z typów komórek NKT jest aktywowany poprzez monomorficzne cząsteczki MHC klasy I, CD1d. Drugi typ komórek NKT rozwija się bez CD1d, ma ekspresję zróżnicowanego repertuaru TCR i występuje głównie w szpiku kostnym i śledzionie (tab. 12.4).

Prezentacja antygenu limfocytom T

Receptory limfocytów T, w przeciwieństwie do przeciwciał, nie rozpoznają antygenów rozpuszczalnych, lecz antygeny związane przez specjalistyczne cząsteczki zdolne do prezentacji tychże antygenów. W rezultacie determinanta antygenowa, którą jest w stanie rozpoznać i związać TCR, stanowi niewielki fragment pierwotnego antygenu. Do cząsteczek aktywnie uczestniczących w procesie prezentacji antygenów zalicza się:

- cząsteczki MHC klasy I,
- cząsteczki MHC klasy II,
- cząsteczki CD1.

Cząsteczki MHC (*major histocompatibility complex*) należą do grupy antygenów głównego układu zgodności tkankowej (u ludzi nazywane HLA – *human leukocyte antigen*). Podzielono je na dwie klasy różniące się budową strukturalną i pełnioną funkcją. Cząsteczki MHC klasy I występują na powierzchni wszystkich komórek jądrzastych, podczas gdy cząsteczki MHC klasy II występują głównie na komórkach zdolnych do prezentacji antygenu, limfocytach B, makrofagach. Pośrednią rolę w prezentacji antygenu pełnią molekuły MHC klasy III, do których zalicza się wiele różnych białek, m.in.: składniki dopełniacza C2, C4 i czynnik B, niektóre czynniki transkrypcyjne czy niektóre białka szoku cieplnego. Cząsteczki MHC charakteryzują się wysokim stopniem polimorfizmu, czyli zmienności strukturalnej, który wynika z istnienia wielu alternatywnych form genów (alleli) MHC w obrębie gatunku. Polimorfizm jest wynikiem konwersji genów, mutacji punktowych, rekombinacji wewnątrzgenowych oraz zjawiska *crossing over*.

Budowa cząsteczek MHC

Cząsteczki MHC klasy I zbudowane są z łańcucha α (łańcuch ciężki) związanego z polipeptydem β2-mikroglobuliną (łańcuch lekki). O ile główną funkcją łańcucha α jest wiązanie antygenu, to rola β2-mikroglobuliny polega na stabilizacji cząsteczki MHC oraz zezwalaniu na jej ekspresję na powierzchni komórki. Długość wiązanego i prezentowanego peptydu w przypadku cząsteczki MHC I wynosi 8–12 aminokwasów.

Cząsteczki MHC klasy II, podobnie jak MHC I, są heterodimerami. Składają się z dwóch łańcuchów α oraz β. Długość wiązanego i prezentowanego peptydu jest większa niż w przypadku MHC I.

Tabela 12.4 Funkcje subpopulacji limfocytów NTK

Subpopulacja	Funkcja
NKT1 (klasyczne)	wykazują silne właściwości immunoregulacyjne; wpływają m.in. na funkcje komórek dendrytycznych, makrofagów, komórek NK, limfocytów T i B
	pełnią rolę ochronną w zakażeniach różnymi mikroorganizmami, m.in. *Pseudomonas aeruginosa, Chlamydia pneumoniae*, wirus grypy, wirusy *Herpes simplex* 1 i 2
	za względu na duże stężenie granzymu B oraz perforyny wykazują aktywność cytolityczną
	wykazują aktywność przeciwnowotworową
	nie podlegają restrykcji CD1d
NKT2	odgrywają rolę immunosupresyjną w niektórych chorobach autoimmunologicznych
	mogą przyczyniać się do hamowania odpowiedzi przeciwnowotworowej
	podlegają restrykcji CD1d

Cząsteczki CD1

Obecność cząsteczek CD1 na powierzchni komórek prezentujących antygeny przyczynia się do zwiększenia spektrum ich działalności. O ile MHC I, jak i MHC II specjalizują się w prezentacji antygenów białkowych, to obecność cząsteczki CD1 gwarantuje możliwość prezentacji antygenów lipidowych. CD1 są to wyspecjalizowane molekuły zdolne do wiązania przede wszystkim bakteryjnych glikolipidów, glikoprotein oraz fosforyzowanych metabolitów bakteryjnych. Budowa receptora CD1 przypomina strukturę cząsteczki MHC I – zbudowana jest z łańcucha α oraz β2-mikroglobuliny. Rowek wiążący antygen CD1 jest większy, głębszy i znacznie bardziej hydrofobowy w porównaniu z rowkiem MHC I i MHC II co wynika z faktu, że cząsteczki CD1 są kodowane poza regionem MHC. Wiąże on hydrofobowe ogony alkilowe lipidów, a bardziej hydrofilowe fragmenty antygenu są wystawione w zewnętrznej części rowka.

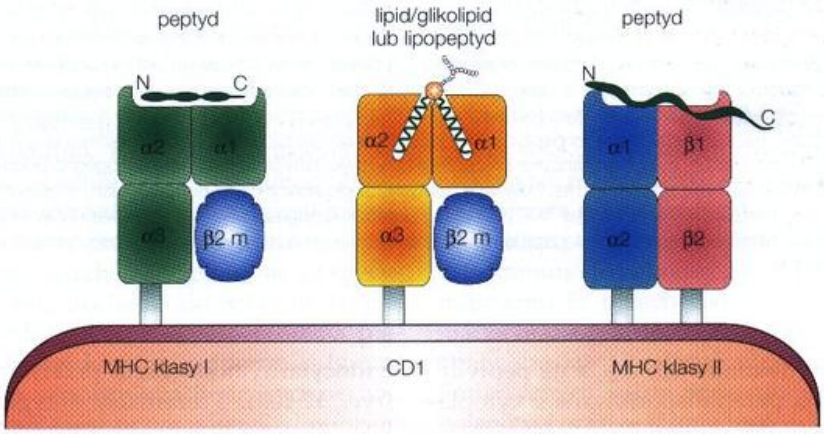
Schemat ilustrujący strukturę molekuł biorących udział w prezentacji antygenów przedstawiono na rycinie 12.9.

Restrykcja MHC

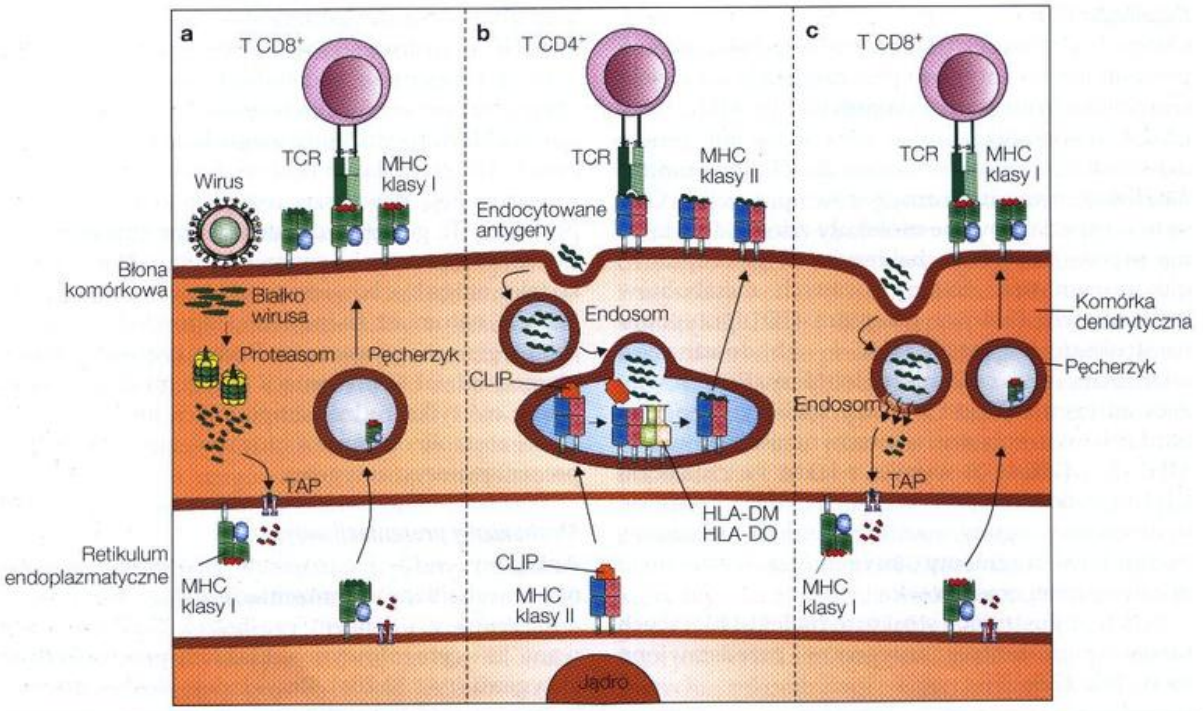
Prezentacja antygenów z udziałem cząsteczek MHC jest kluczowym momentem inicjacji odpowiedzi immunologicznej. Istnieje jednak pewna restrykcja odnosząca się do określonej subpopulacji limfocytu T, któremu zostanie zaprezentowany antygen, i klasy MHC uczestniczącej w tym procesie. Cząsteczka MHC I kooperuje z molekułą kostymulującą CD8 obecną na powierzchni limfocytów Tc, natomiast cząsteczka MHC II oddziałuje z molekułą CD4 na limfocytach Th. Zjawisko to nosi nazwę restrykcji MHC. Konsekwencją powyższej restrykcji jest to, że subpopulacja Tc generuje odpowiedź immunologiczną skierowaną przeciwko antygenom endogennym (tylko takie mogą być bowiem prezentowane z udziałem MHC I), natomiast Th indukują odpowiedź przeciwko antygenom egzogennym. Rodzaj cząsteczki MHC biorącej udział w prezentacji antygenu determinuje zatem nie tylko rodzaj subpopulacji limfocytów T, której zostanie on zaprezentowany, ale również typ prezentowanego antygenu.

Mechanizmy prezentacji antygenu

Antygeny endo- i egzogenne podlegają odmiennym mechanizmom prezentacji. Proces prezentacji antygenów z udziałem cząsteczek MHC I nazywany jest **cytozolowym szklakiem przetwarzania antygenu** (ryc. 12.10a). Przykładem dobrze ilustrującym powyższy mechanizm jest zakażenie wirusowe. Genom wirusa zostaje włączony do genomu zainfekowanej komórki, a następnie uruchomiany jest proces syntezy białek wirusa na „własnej linii produkcyjnej" komórki gospodarza. Powstałe białka trafiają do proteasomu – multienzymatycznego



Rycina 12.9 Struktura cząsteczek uczestniczących w prezentacji antygenów. Cząsteczki MHC I i CD1 posiadają trzy domeny zewnątrzkomórkowe (α1, α2 i α3) oraz miejsce wiążące β2-mikroglobulinę. W przypadku obu molekuł fragment domeny α3 stanowi jedyny region zakotwiczający molekułę w błonie komórkowej. Cząsteczka MHC II jest heterodimerem dwóch transbłonowych łańcuchów polipeptydowych (α i β). W przypadku MHC I oba końcowe fragmenty związanego peptydu mieszczą sie w rowku, co limituje wielkość związanego antygenu. MHC II może wiązać znacznie dłuższy łańcuch peptydowy antygenu, którego N i C końce „wystają" poza rowek cząsteczki. Rowek cząsteczki CD1 jest większy, głębszy i znacznie bardziej hydrofobowy. Wiąże on ogony alkilowe lipidów tak, że hydrofilowe części antygenu są wystawione na zewnątrz. We wszystkich trzech przypadkach związanie ligandu z cząsteczkami warunkuje utworzenie trwałych kompleksów, które są rozpoznawane przez receptory limfocytów T.



Rycina 12.10 Mechanizmy prezentacji antygenów. **a.** Proces prezentacji antygenów z udziałem cząsteczek MHC I – cytozolowy szlak przetwarzania antygenu. Przykładem dobrze ilustrującym powyższy mechanizm jest zakażenie wirusowe. W wyniku włączenia genomu wirusa do genomu zainfekowanej komórki zostaje uruchomiony proces syntezy białek wirusa, które trafiają do proteasomu. Powstałe w wyniku enzymatycznej obróbki peptydy, dzięki transporterom TAP obecnym w błonie siateczki śródplazmatycznej, zostają przetransportowane z cytoplazmy do światła siateczki, gdzie asocjują z molekułą MHC I. Kompleks antygen–MHC I przechodzi przez aparat Golgiego, gdzie podlega glikozylacji, po czym przedostaje się na powierzchnię komórki i może być rozpoznany przez receptor limfocytu Tc. **b.** Ze względu na pochodzenie antygenu prezentację z udziałem cząsteczek MHC II nazywa się endocytarnym szlakiem przetwarzania antygenu. Prezentacja antygenu przez MHC klasy II dotyczy bowiem antygenów egzogennych, a więc takich, które są wychwytywane przez komórki prezentujące antygeny na drodze endocytozy. Antygen przedostaje się do przedziału endosomalnego, gdzie podlega fragmentacji do peptydów. W ten sposób zostaje przygotowany do połączenia się z cząsteczką MHC klasy II. Bezpośrednio po zakończeniu syntezy cząsteczki MHC II jej rowek zostaje „zablokowany" peptydem CLIP (*class II associated invariant peptide*), którego główne zadanie polega na zabezpieczeniu rowka przed przyłączeniem jakiegoś innego, przypadkowego peptydu obecnego w siateczce. Kompleks MHC przechodzi następnie przez aparat Golgiego do endosomów. W kolejnym etapie, z udziałem nieklasycznych cząsteczek MHC klasy II: HLA-DO i HLA-DM, dochodzi do usunięcia peptydu CLIP z rowka cząsteczki MHC klasy II i zastąpienia go peptydem pochodzącym z antygenu. Transport kompleksów peptyd-MHC klasy II na powierzchnię komórki, umożliwia prezentację antygenu i jego rozpoznanie przez TCR limfocytu Th. **c.** W mechanizmie prezentacji krzyżowej antygenu antygeny egzogenne podlegają fragmentacji w przedziale endosomalnym komórki dendrytycznej. Powstałe peptydy, dzięki specyficznej budowie błony endosomu, przedostają się do cytozolu, a następnie, z udziałem transporterów TAP, do światła siateczki śródplazmatycznej szorstkiej. W świetle siateczki dochodzi do utworzenia kompleksu MHC I–antygen, który to zostaje przetransportowany na powierzchnię komórki, gdzie dochodzi do rozpoznania antygenu przez TCR Tc.

kompleksu, który dokonuje ich cięcia na peptydy. Peptydy te zostają przetransportowane z cytoplazmy podstawowej do siateczki śródplazmatycznej, w świetle której asocjują z molekułą MHC I. Kompleks antygen-MHC I przechodzi przez aparat Golgiego, gdzie podlega glikozylacji, po czym przedostaje się na powierzchnię komórki i może być rozpoznany przez limfocyty Tc.

Ze względu na pochodzenie antygenu prezentację z udziałem cząsteczek MHC II nazywa się **endocytarnym szlakiem przetwarzania antygenu** (ryc. 12.10b). Prezentacja antygenu przez MHC klasy II dotyczy bowiem antygenów egzogennych (z punktu widzenia komórki, niekoniecznie zaś organizmu), a więc takich, które są wychwytywane przez komórki prezentujące antygeny drogą endocytozy. Antygen przedostaje się do przedziału endosomalnego, gdzie podlega fragmentacji do peptydów. W ten sposób zostaje on przygotowany do połączenia się z cząsteczką MHC klasy II.

Powstanie kompleksu antygen–MHC II, który przenoszony jest na powierzchnię komórki, skutkuje inicjacją odpowiedzi immunologicznej z udziałem limfocytów Th.

Analizując kwestię prezentacji antygenów egzogennych, należy wspomnieć o **mechanizmie prezentacji krzyżowej** (ryc. 12.10 c). Choć nie jest on w pełni poznany, wydaje się znaczący w przebiegu odpowiedzi przeciwwirusowej, a co więcej może mieć kluczowe znaczenie w terapii przeciwnowotworowej. W mechanizmie tym antygeny egzogenne mogą być prezentowane przez cząsteczki MHC I oraz konwencjonalnie przez cząsteczki MHC II. Tym samym w odpowiedź immunologiczną, będącą skutkiem prezentacji krzyżowej, zaangażowane będą zarówno limfocyty Th, jak i Tc. Komórkami zdolnymi do prezentacji krzyżowej są komórki dendrytyczne. Nie tylko ze względu na to, że dysponują obiema cząsteczkami (MHCI i MHC II) na swojej powierzchni, ale przede wszystkim ze względu na obecność endosomów, których błona komórkowa może być „przepuszczalna" dla oligopeptydów powstałych w wyniku rozpadu antygenów egzogennych. Znajdujący się w cytozolu oligopeptyd jest traktowany przez komórkę jako antygen endogenny i podlega prezentacji z udziałem cząsteczek MHC I.

Odpowiedź humoralna

Limfocyty B

Proces różnicowania i dojrzewania linii komórek B można podzielić na dwa etapy: na fazę „niezależną od antygenu" i fazę „zależną od antygenu". Pierwsza faza rozwoju limfocytów B zachodzi w szpiku kostnym. Komórki ukierunkowują się do linii B, a następnie, po przejściu kilku etapów, dojrzewają do postaci komórek B charakteryzujących się obecnością powierzchniowych immunoglobulin klasy M. Komórki te wydostają się ze szpiku i migrują do ośrodków rozmnażania w obwodowych narządach limfatycznych. Jeśli zetkną się ze specyficznym antygenem, dochodzi do rozwoju drugiej fazy „zależnej od antygenu" aż do szczebla plazmocytu, efektorowej komórki odporności humoralnej. Wynikiem procesów zachodzących w obu fazach różnicowania jest przygotowanie limfocytu do produkcji przeciwciał o określonej strukturze molekularnej przystosowanej do rozpoznawania określonej grupy antygenów. To właśnie produkcja przeciwciał rozpoznających antygen jest zasadniczą funkcją limfocytów typu B, określaną mianem odpowiedzi typu humoralnego.

Kompleks receptorowy limfocytu B

Kompleks receptorowy limfocytu B składa się z zakotwiczonego w błonie komórkowej przeciwciała (immunoglobuliny) oraz kooperujących z nim dwóch łańcuchów polipeptydowych: Igα i Igβ. W odróżnieniu od przeciwciała wydzielanego przez limfocyt B, przeciwciało obecne w błonie komórkowej posiada dodatkową domenę transbłonową oraz wewnątrzkomórkową, natomiast jego swoistość i powinowactwo do antygenu jest takie samo, jak w przypadku przeciwciał wydzielanych przez dany klon limfocytów. Ponadto klasa przeciwciała zakotwiczonego w błonie jest taka sama, jaką będą miały przeciwciała wydzielane przez limfocyt, np. limfocyt B IgM^+ będzie wydzielał przeciwciała IgM, których postać związana z jego błoną komórkową będzie pełniła funkcję receptora. Główną funkcją receptorów limfocytów B jest determinowanie swoistości wiązania antygenu, natomiast łańcuchy polipeptydowe Igα i Igβ odbierają zmiany konformacyjne przeciwciała błonowego i aktywują kinazy odpowiedzialne za transdukcję sygnału do komórki. Pełnią one zatem analogiczną rolę jak cząsteczki CD3 w kompleksie TCR.

Dojrzewanie limfocytów B

W mikrośrodowisku szpiku kostnego ze wspólnych progenitorów limfoidalnych (CLs) rozwija się wczesny limfocyt B. W kolejnych etapach różnicowania zachodzą zmiany obejmujące ekspresję określonych antygenów jądrowych, cytoplazmatycznych i powierzchniowych oraz dochodzi do rearanżacji genów kodujących przeciwciała, decydującej o ich różnorodności. Pierwszym receptorem pojawiającym się w błonie komórkowej limfocytu B jest receptor IgM. Na tym etapie dojrzewania zachodzi proces selekcji, w którym eliminowane są komórki efektywnie rozpoznające autoantygeny. Za ostateczną, dojrzałą postać limfocytu B uważa się komórkę wykazującą ekspresję wspomnianego wyżej receptora immunoglobulinowego IgM, IgD, receptora dla fragmentu Fc przeciwciał i dla składników dopełniacza oraz MHC II. Dojrzałe limfocyty B zasiedlają strefy grasiczoniezależne obwodowych narządów limfatycznych, gdzie pod wpływem stymulacji antygenowej oraz ze strony limfocytów Th proliferują i ulegają aktywacji. Stymulowane limfocyty B tracą powierzchniowe receptory IgM i IgD, przełączając się na syntezę IgG i IgA. Część z nich różnicuje się w komórki B pamięci gotowe do odpowiedzi wtórnej przy ponownym kontakcie z antygenem, pozostałe przekształcają się w efektorowe komórki odpowiedzi humoralnej – komórki plazmatyczne.

Subpopulacje limfocytów B

Pomimo iż definiowanie subpopulacji limfocytów B nie jest tak powszechne jak w przypadku limfocytów T, należy zauważyć, że limfocyty B nie stanowią jednorodnej grupy komórek – różnią się zarówno fenotypem, jak i specyfiką pełnionych funkcji. Najbardziej liczną subpopulację stanowią **limfocyty B2** – określane mianem konwencjonalnych limfocytów B. Stanowią one około 90% limfocytów krwi obwodowej u człowieka i uczestniczą głównie w obronie nabytej, wytwarzając wszystkie klasy przeciwciał. Z udziałem limfocytów T przechodzą takie procesy, jak przełączanie klas przeciwciał czy dojrzewanie powinowactwa. Pozostałe limfocyty B opisywane są jako komórki **B1** – nieklasyczne limfocyty B. W zależności od obecności na powierzchni komórki molekuły CD5 wśród limfocytów B1 wyróżnia się subpopulację **B1a** ($CD19^+CD5^+$) oraz **B1b** ($CD19^+CD5^-$). Komórki B1 występują w dużej liczbie we krwi pępowinowej oraz w pewnych stanach patologicznych. Są zdolne do syntezy wyłącznie dwóch klas immunoglobulin: IgM oraz IgG, a ich główną funkcją jest prawdopodobnie udział w usuwaniu pozostałości po apoptozie komórek w organizmie. Ich ciągłe pobudzenie oraz możliwość wiązania fizjologicznych ligandów jest prawdopodobnie przyczyną ich częstego występowania w formie autoagresywnych komórek w chorobach autoimmunizacyjnych.

Przeciwciała

Budowa przeciwciał

Przeciwciała (immunoglobuliny) są glikoproteinami wykazującymi zdolność do rozpoznawania i wiązania antygenów, stanowiącymi główną komponentę humoralnej odpowiedzi immunologicznej. Zdolność do naturalnej produkcji przeciwciał wykazują limfocyty B pobudzone do różnicowania w kierunku komórek plazmatycznych. Cząsteczka przeciwciała zbudowana jest z czterech łańcuchów polipeptydowych: dwóch lekkich (L – *light*) i dwóch ciężkich (H – *heavy*). Każdy łańcuch lekki jest kowalencyjnie połączony z łańcuchem ciężkim wiązaniami dwusiarczkowymi. W zależności od typu łańcucha ciężkiego występującego w cząsteczce wyróżnia się pięć klas przeciwciał: IgA, IgD, IgE, IgG oraz IgM, różniących się nie tylko strukturą, ale również pełnionymi funkcjami (tab. 12.5). Szczegółową budowę przeciwciał przedstawiono na ryci-

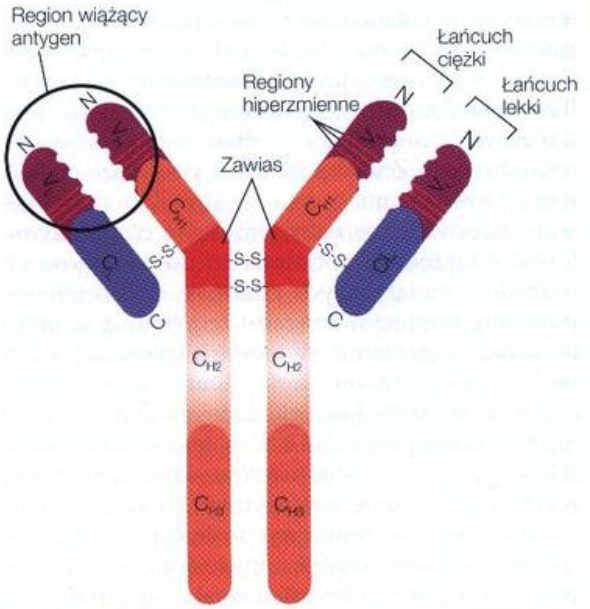
Tabela 12.5 Charakterystyka klas przeciwciał

Klasa	Charakterystyka
IgA	wytwarzane głównie w błonach śluzowych obecne w wydzielinach gruczołów potowych i łojowych stanowią 13% immunoglobulin obecnych w surowicy zapobiegają kolonizacji patogenów na błonach śluzowych i pośredniczą w ich fagocytozie
IgD	obecne na powierzchni dziewiczych limfocytów B jako receptory immunoglobulinowe biorą udział w indukowaniu dojrzewania powinowactwa przeciwciał receptory dla fragmentów Fc występują na niektórych limfocytach T 1% immunoglobulin w surowicy
IgE	wiążąc się z odpowiednimi receptorami Fc na komórkach tucznych, wywołują ich degranulację, uczestniczą w zjawiskach nadwrażliwości typu I uczestniczą w reakcjach zapalnych przeciwko zakażeniom pasożytniczym receptory dla fragmentów Fc występują na eozynofilach 0,002% immunoglobulin w surowicy
IgG	aktywują układ dopełniacza pełnią istotną rolę w walce z mikroorganizmami obecność receptora dla fragmentu Fc IgG na komórkach K umożliwia zabicie komórek opłaszczonych IgG (cytotoksyczność zależna od przeciwciał) obecność receptora dla fragmentu Fc IgG na komórkach żernych determinuje fagocytozę cząstek opłaszczonych IgG (immunofagocytoza) są transportowane przez łożysko z organizmu matki do płodu stanowią 80% immunoglobulin w surowicy
IgM	syntetyzowane w początkowej fazie odpowiedzi immunologicznej pierwsze przeciwciała syntetyzowane w rozwoju osobniczym efektywnie aktywują układ dopełniacza receptory dla fragmentów Fc występują na komórkach żernych stanowią 6% immunoglobulin obecnych w surowicy

nie 12.11. Miejscem odpowiedzialnym za wiązanie antygenu jest tzw. fragment Fab (*fragment antigen binding*) przeciwciała. Pozostały fragment cząsteczki przeciwciała nosi nazwę fragmentu Fc (*fragment crystallizable*) i pełni funkcję efektorową. Wiele komórek układu immunologicznego wykazuje ekspresję receptora dla fragmentu Fc, a kooperacja obu molekuł może indukować m.in. zjawisko immunofagocytozy oraz cytotoksyczności zależnej od przeciwciał.

Źródła różnorodności przeciwciał

U podstaw zmienności przeciwciał leży istnienie wielu różnych odcinków w pierwotnych genach immunoglobulinowych, które w rezultacie łączenia się ze sobą tworzą funkcjonalny gen dla części zmiennej przeciwciał. Najważniejszym zjawiskiem podczas generowania zmienności jest niewątpliwie zmienność kombinacyjna. Polega ona na tym, że pod wpływem działania określonych enzymów zbliżone do siebie zostają pojedyncze segmenty genów. Przypadkowe łączenie wielu wariantów genów w drodze rekombinacji nie jest jedynym mechanizmem zapewniającym powstanie różnorodnych przeciwciał. Wykazano bowiem, że w trakcie tworzenia się ostatecznej sekwencji dochodzi zarówno do usunięcia, jak i wstawienia pewnej liczby nukleotydów. Zjawisko to nosi nazwę zmienności na złączach i odbywa się bezmatrycowo. Dodatkowym zjawiskiem zwiększającym różnorodność immunoglobulin są mutacje somatyczne prowadzące do zmiany pojedynczych aminokwasów. Dzięki powyższym procesom liczba różnych wariantów przeciwciał wynosi około 10^{10}– 10^{11}.



Rycina 12.11 Schemat budowy przeciwciała. Przeciwciało zbudowane jest z czterech łańcuchów polipeptydowych: dwóch lekkich (L – *light*) i dwóch ciężkich (H – *heavy*). Łańcuchy ciężkie są dłuższe i związane ze sobą wiązaniami dwusiarczkowymi. Miejsce występowania mostków dwusiarczkowych łączących łańcuchy ciężkie stanowi region zawiasowy, który warunkuje możliwość rozchylania się ramion przeciwciała. Łańcuchy lekkie są krótsze i wiążą się z łańcuchami ciężkimi również za pomocą mostków dwusiarczkowych. Każdy łańcuch posiada część stałą (C – *constant*), która jest taka sama u wszystkich przeciwciał danej klasy, oraz część zmienną (V – *variable*), różniącą się wśród przeciwciał o różnej swoistości. Część zmienna łańcucha ciężkiego nosi nazwę VH, zaś łańcucha lekkiego – VL. Części stałe zaś są oznaczone symbolami CH w łańcuchu ciężkim i CL w łańcuchu lekkim, przy czym każda domena części stałej łańcucha ciężkiego jest oznaczona cyfrą.

Właściwości przeciwciał

Cechami charakteryzującymi przeciwciała są: wartościowość, powinowactwo, awidność (zachłanność).

Wartościowość – jest to liczba determinant antygenowych (epitopów), które może związać cząsteczka przeciwciała. Wartościowość danej immunoglobuliny jest uzależniona od formy przeciwciała. Immunoglobuliny występujące jako monomery mają dwa miejsca wiążące, są zatem dwuwartościowe (IgG, IgD i IgE). Immunoglobulina IgA, która może występować w formie monomeru, dimeru, a nawet w formie tetrameru, posiada wartościowość odpowiednio 2, 4 i 8. Najwyższą wartościowością (10) charakteryzuje się IgM występująca jako pentamer.

Powinowactwo przeciwciała jest to siła, z jaką wiązana jest pojedyncza determinanta antygenowa. Jest ono zależne od szybkości tworzenia się wiązań między determinantą a miejscem wiążącym antygen, od stopnia „dokładności" ich dopasowania oraz sił uczestniczących w powstawaniu kompleksu (siły elektrostatyczne, wiązania wodorowe, oddziaływania hydrofobowe oraz siły Van der Waalsa).

Awidność (zachłanność) przeciwciała jest pojęciem bliskim powinowactwu, określa jednak siłę wiązania antygenów wielowartościowych, czyli posiadających więcej niż jedną determinantę antygenową. Awidność definiowana jest jako siła wiązania pomiędzy przeciwciałem a kompleksem determinant antygenowych, stanowi tym samym odzwierciedlenie całościowej interakcji antygenu z przeciwciałem. Badania awidności przeciwciał są wykorzystywane w diagnostyce laboratoryjnej w celu wykluczenia lub potwierdzenia występowania wielu infekcji.

Udział przeciwciał w odpowiedzi immunologicznej to:

- Bezpośrednie neutralizowanie wirusów i bakterii poprzez blokowanie fragmentów krytycznych dla ich aktywności.
- Aktywacja składników dopełniacza.
- Wzmocnienie aktywności fagocytarnej komórek żernych mających receptor dla fragmentu Fc przeciwciała.
- Udział w zjawisku cytotoksyczności zależnej pod przeciwciał – przeciwciała opłaszczają komórkę docelową, a komórki efektorowe wiążąc końce fragmentów Fc przeciwciał, generują efekt cytotoksyczny.

Zastosowanie przeciwciał w medycynie

Przeciwciała stanowią obecnie jedno z najważniejszych narzędzi nowoczesnej medycyny. Wykorzystanie przeciwciał wykracza szeroko poza diagnostykę laboratoryjną i obejmuje terapię chorób infekcyjnych, nowotworowych czy autoimmunologicznych oraz transplantologię i leczenie antykoagulacyjne. Spektrum zastosowań przeciwciał poszerza się wraz z rozwojem biotechnologii i technik biologii molekularnej, które pozwalają na projektowanie immunoglobulin o określonych właściwościach. W zależności od spektrum specyficzności otrzymywanych przeciwciał, wyróżnia się przeciwciała poli- i monoklonalne. Tradycyjną metodą produkcji przeciwciał poliklonalnych jest immunizacja zwierząt określonym antygenem, a następnie izolacja immunoglobulin z surowicy krwi. Otrzymane w ten sposób przeciwciała są zdolne do rozpoznania różnych epitopów danego antygenu. W przeciwieństwie do nich, przeciwciała monoklonalne są produkowane przez klon limfocytów B, wywodzący się od pojedynczego limfocytu. Takie przeciwciała rozpoznają tylko jeden konkretny epitop danego antygenu i zawsze należą do identycznej klasy przeciwciał. Produkcja przeciwciał monoklonalnych opiera się na fuzji komórek szpiczaka z limfocytami B o żądanej swoistości. W zdrowym organizmie człowieka produkowane są wyłącznie przeciwciała poliklonalne.

Pamięć immunologiczna

Jest to właściwość charakteryzująca wyłącznie swoistą odpowiedź immunologiczną. Mechanizmy pamięci immunologicznej powodują, że wtórny kontakt z antygenem uruchamia szybszą, bardziej intensywną i dłużej trwającą odpowiedź immunologiczną w porównaniu z odpowiedzią pierwotną. Jednym ze zjawisk gwarantujących prawidłowe funkcjonowanie mechanizmu pamięci immunologicznej jest zwiększenie liczby limfocytów odpowiadających na dany antygen w czasie pierwotnej odpowiedzi immunologicznej. Ponadto wykazano, że okres życia komórek pamięci jest znacznie dłuższy niż pozostałych komórek immunologicznych. Trzecim zjawiskiem tłumaczącym mechanizm pamięci immunologicznej jest nieprzerwana stymulacja limfocytów. W przypadku limfocytów T czynnikiem stymulującym są antygeny związane z receptorami na powierzchni komórek dendrytycznych, natomiast limfocyty B poprzez nieustanną produkcję i supresję przeciwciał, z których niektóre naśladują determinanty antygenowe, stymulują powstawanie nowych immunoglobulin zdolnych do wiązania antygenu przy wtórnym kontakcie.

Recyrkulacja limfocytów

Recyrkulacja limfocytów jest zjawiskiem zapewniającym nieustanną gotowość organizmu do rozpoznania antygenu i indukcji swoistej odpowiedzi immunologicznej. Immunokompetentne postaci limfocytów migrują z centralnych narządów limfoidalnych i zasiedlają określone rejony narządów obwodowych. Z uwagi na to, że powyższe postaci limfocytów nie miały jeszcze kontaktu z antygenem, nazywa się je naiwnymi bądź dziewiczymi. Część z limfocytów po dotarciu do obwodowych narządów limfatycznych pozostaje na ich terenie, pozostałe (limfocyty krążące) recyrkulują w obrębie całego organizmu. W węzłach chłonnych szlak wędrówki limfocytów: krew – limfa – krew, rozpoczyna się w strefie kory głębokiej narządu. W rejonie tym występują żyłki z wysokim śródbłonkiem (HEV – *high endothelial venules*), które warunkują wybiórczą migrację limfocytów. Po opuszczeniu światła naczynia limfocyty docierają do miąższu narządu i jeśli nie ulegną aktywacji przez antygen, przepływają przez sieć zatok węzła i opuszczają go drogą naczyń limfatycznych odprowadzających. W procesie recyrkulacji zasadniczą rolę pełnią cząsteczki adhezyjne. Na limfocytach nazywane są receptorami zasiedlania, a na powierzchni śródbłonka – adresynami naczyniowymi. Przejście komórek przez ścianę HEV jest procesem wieloetapowym. Etap I umożliwia bezpośredni kontakt limfocytów ze śródbłonkiem, dzięki łączeniu się selektyn (obecnych na komórkach śródbłonka) z ligandami oligosacharydowymi limfocytów. Wiązanie to jest jednak zbyt słabe, aby mogło przeciwdziałać napierającemu prądowi krwi, stąd nie dochodzi do całkowitego zatrzymania komórek, ale do ich toczenia umożliwiającego aktywację limfocytów.

W drugim etapie następuje aktywacja limfocytów, a wydzielane przez nie cytokiny zwiększają powinowactwo receptorów zasiedlania do odpowiednich ligandów. Dochodzi wówczas do zatrzymania przepływu komórek. Kolejny etap związany jest z silną adhezją limfocytów do śródbłonka, w której pośredniczą integryny. W ostatnim etapie dochodzi do opuszczenia światła naczynia przez limfocyty.

Dzięki nieustannej recyrkulacji limfocytów możliwa jest rekrutacja komórek i ich zaangażowanie w indukcję odpowiedzi immunologicznej w momencie pojawienia się antygenu w danym obszarze narządów obwodowych.

Regulacja odpowiedzi immunologicznej

Rola antygenu

Obecność antygenu jest podstawowym czynnikiem indukującym odpowiedź immunologiczną. Zwrócić należy uwagę na fakt, że rozpoznawane są nie całe cząsteczki antygenu, ale pewien ich fragment bądź układ nazywany epitopem. W przypadku odpowiedzi komórkowej istotne jest pochodzenie antygenu: antygeny endogenne prezentowane przez MHC I aktywują subpopulację limfocytów Tc, wywołując efekt cytotoksyczny, natomiast egzogenne – prezentowane przez MHC II, angażują limfocyty Th. Właściwości chemiczne antygenu to kolejny czynnik decydujący o efektywności i rodzaju odpowiedzi immunologicznej – polisacharydy indukują syntezę IgM, wywołując w ten sposób odpowiedź humoralną, natomiast antygeny białkowe mogą aktywować oba typy odpowiedzi immunologicznej. Istotna jest również dawka i sposób podania antygenu. Wykazano, że zbyt duża dawka antygenu może indukować tolerancję immunologiczną, a indukcja odpowiedzi może zaistnieć wyłącznie w przypadku średnich dawek. Antygeny podane podskórnie i śródskórnie indukują odpowiedź immunologiczną, antygeny podawane doustnie, dożylnie i donosowo mogą indukować tolerancję. Usunięcie antygenu z organizmu prowadzi jednocześnie do usunięcia źródła stymulacji odpowiedzi immunologicznej.

Regulacja na poziomie genów

Najważniejszą rolę w regulacji odpowiedzi immunologicznej limfocytów mają geny głównego układu zgodności tkankowej oraz geny immunoglobulinowe. Ich polimorfizm stwarza szansę na wiązanie nowych peptydów powstających na skutek mutacji mikroorganizmów.

Znaczenie komórek dendrytycznych

Wyniki najnowszych badań jednoznacznie pokazują, że komórki dendrytyczne są jednym z najważniejszych elementów regulujących odpowiedź immunologiczną. Mogą one bowiem wpływać na subpopulacje limfocytów T. Komunikacja komórek dendrytycznych z limfocytami T odbywa się poprzez dwa jednoczasowe sygnały. Pierwszy oparty jest na wzajemnym kontakcie receptora TCR z MHC. Drugi sygnał pochodzi od molekuł kostymulujących obecnych na powierzchni komórek dendrytycznych. Komórki dendrytyczne, które utraciły zdolność aktywacji limfocytów T na skutek nieprawidłowego różnicowania, czy też działania hamujących cytokin, mogą doprowadzać do anergii limfocytów T, a nawet do ich apoptozy. Warto jednocześnie dodać, że przekazywanie sygnałów pomiędzy komórkami prezentującymi antygen a limfocytami zachodzi dwukierunkowo.

Udział przeciwciał

W zależności od typu przeciwciała mogą wzmacniać lub hamować odpowiedź immunologiczną. Wysokie stężenie IgM wraz z wysokim stężeniem danego antygenu przyczynia się do silnego wzmocnienia odpowiedzi immunologicznej, podczas gdy IgG jest immunoglobuliną hamującą. Proces wyciszania odpowiedzi immunologicznej przez IgG może być oparty na dwóch mechanizmach: blokowanie przeciwciałem i wiązanie krzyżowe receptora. Wysokie dawki wolnej IgG blokują interakcje pomiędzy epitopem danego antygenu a immunoglobulinowym receptorem limfocytu B, co uniemożliwia jego rozpoznanie. Wiązanie krzyżowe receptora zachodzi w przypadku, kiedy kompleks przeciwciało-antygen wiąże się jednocześnie z receptorem immunoglobulinowym oraz cząsteczką CD32 obecną na powierzchni limfocytu B. Powyższa interakcja skutkuje zmniejszeniem ilości wytwarzanych przeciwciał przeciwko danemu antygenowi.

Regulacja neuroendokrynowa

Kontrolę nad przebiegiem odpowiedzi immunologicznej sprawuje oś podwzgórze-przysadka-nadnercza. Komórki układu limfatycznego wyposażone są w receptory dla wielu hormonów i neuropeptydów. Uważa się, że za pośrednictwem receptorów układ nerwowy i endokrynowy regulują funkcję układu immunologicznego. Poniżej przedstawiono przykłady działania niektórych hormonów:

somatostatyna – hamuje odpowiedź humoralną i aktywację limfocytów T;

glikokortykosteroidy – przyczyniają się do redukcji liczby krążących limfocytów, monocytów i eozynofilii, a ponadto tłumią odpowiedź komórkową poprzez hamowanie wydzielania cytokin prozapalnych. Wpływ glikokortykosteroidów dotyczy także komórek dendrytycznych (osłabianie procesu prezentacji antygenów) oraz komórek tucznych (hamowanie funkcji);

progesteron – wykazuje działanie immunosupresyjne;

prolaktyna – wzmaga odpowiedź immunologiczną, hamuje aktywność komórek NK.

Tolerancja immunologiczna

Tolerancja immunologiczna jest cechą charakteryzującą układ odpornościowy polegającą na braku inicjacji odpowiedzi immunologicznej (komórkowej i humoralnej) na określony antygen. Jeśli zjawisko to dotyczy antygenów własnych, nazywa się je autotolerancją. U podstaw tego zjawiska leżą następujące mechanizmy: delecja klonalna, anergia klonalna, aktywna supresja.

Delecja klonalna

Proces delecji klonalnej zachodzi zarówno w centralnych, jak i obwodowych narządach limfatycznych i prowadzi do eliminacji limfocytów zdolnych do rozpoznawania autoantygenów. Najbardziej intensywna delecja klonalna odbywa się w grasicy i szpiku kostnym. Jednak ze względu na to, iż w obrębie tych narządów nie ma dostępu do wszystkich autoantygenów, konieczna jest indukcja tolerancji na obwodzie. Proces obwodowej delecji klonalnej jest indukowany przez układ białek receptorów Apo-1/Fas i ligand FasL.

Anergia klonalna

Anergia klonalna to proces prowadzący do czynnościowej inaktywacji autoreaktywnych limfocytów, które uniknęły delecji klonalnej. Aby mogły wygenerować odpowiedź immunologiczną, limfocyty naiwne muszą otrzymać dwa sygnały: jeden – pochodzący od receptora TCR, drugi – od cząsteczek kostymulujących, obecnych na komórkach profesjonalnie prezentujących antygeny. Dostarczenie limfocytowi tylko jednego sygnału powoduje, że może on produkować niektóre limfokiny, ale ze względu na wydłużony okres interfazy nie podlega podziałom komórkowym.

Autoreaktywne limfocyty B do indukcji odpowiedzi immunologicznej wymagają stymulacji ze strony limfocytów T. Biorąc pod uwagę, że większość autoreaktywnych limfocytów T ulega apoptozie w grasicy, podczas kontaktu z autoantygenem limfocyt B nie uzyska sygnałów kostymulujących ze strony limfocytów Th (gdyż uległy one wcześniej apoptozie) i stanie się anergiczny.

Aktywna supresja

Kolejnym mechanizmem uczestniczącym w powstawaniu tolerancji jest aktywna supresja, która zachodzi dzięki aktywności populacji limfocytów regulatorowych (Treg). Efekt supresorowy tych komórek zależy prawdopodobnie od bezpośredniego kontaktu z komórkami docelowymi. Komórki Treg obecne w węzłach chłonnych uniemożliwiają trwałe połączenie komórek dendrytycznych prezentujących autoantygen z limfocytami, natomiast w tkankach zapobiegają aktywacji limfocytów autoreaktywnych poprzez indukcję zmian fenotypowych lokalnych komórek dendrytycznych. Właściwości supresyjne Treg mogą być również skutkiem działania wydzielanych przez nie cytokin.

Przykłady chorób immunizacyjnych

Deficyty immunologiczne

KLINIKA

Prawidłowe funkcjonowanie układu immunologicznego uwarunkowane jest ścisłą kooperacją wszystkich jego elementów. Brak lub nieprawidłowe funkcjonowanie któregokolwiek elementu może skutkować zaburzeniami funkcjonowania całego układu, a co za tym idzie całego organizmu. Niedobory odporności można podzielić na **pierwotne** – zwykle dziedziczne, i **wtórne**, będące konsekwencją innych jednostek chorobowych i ich leczenia (tab. 12.6).

Pierwotne deficyty immunologiczne

Zaburzenia występujące w obszarze pierwotnych niedoborów immunologicznych mogą dotyczyć ilościowych bądź jakościowych zmian w komórkach (limfocyty, komórki żerne) bądź w cząsteczkach (przeciwciała, cytokiny, układ dopełniacza) układu odpornościowego.

Zespół DiGeorge'a

Choroba DiGeorge'a spowodowana jest zaburzeniami w rozwoju grasicy wynikającymi z nieprawidłowego rozwoju struktur wywodzących się z 3 i 4 kieszonki gardłowej. Wada stanowi następstwo delecji fragmentu chromosomu 22. Niedobory komórkowe dotyczą głównie limfocytów, których

Tabela 12.6 Klasyfikacja pierwotnych niedoborów odporności (jednostki chorobowe oznaczone* zostały omówione w tekście)

Niedobory immunologiczne z przewagą zaburzeń czynności limfocytów T	zespół DiGeorge'a* selektywny niedobór limfocytów T z obniżoną aktywnością fosforylazy nukleozydów purynowych
Niedobory immunologiczne z przewagą zaburzeń produkcji przeciwciał	agammaglobulinemia sprzężona z chromosomem X (agammaglobulinemia Brutona)* pospolity zmienny niedobór immunologiczny izolowany niedobór IgA niedobór podklas IgG niedobór odporności ze zwiększeniem stężenia IgM przemijająca hipogammaglobulinemia niemowląt niedobór odporności z grasiczakiem
Skojarzone zaburzenia limfocytów B i T	zespół Wiskotta i Aldricha zespół ataksji-teleangiektazji ciężki złożony niedobór odporności * niedobór deaminazy adenozynowej dysgenezja układu siateczkowatego hipoplazja chrząstek i włosów zespół Omenna zespół nagich limfocytów
Zaburzenia czynności komórek żernych	przewlekła choroba ziarniniakowa zespół Chediaka-Higashiego niedobór cząstek adhezyjnych
Niedobory składników dopełniacza	niedobory składników wczesnych etapów klasycznej drogi aktywacji dopełniacza: kłębuszkowe zapalenie nerek; toczeń układowy rumieniowaty; zapalenie skórno-mięśniowe; obrzęk naczynioruchowy Quinckego niedobory składników alternatywnej drogi aktywacji dopełniacza niedobór C3 niedobory końcowej drogi etapów klasycznej drogi aktywacji dopełniacza

liczba jest drastycznie zredukowana. Obserwuje się obecność nielicznych limfocytów T i zmniejszoną liczbę limfocytów B – gdyż ich różnicowanie wymaga obecności limfocytów T. U chorych wielkość węzłów chłonnych jest znacznie mniejsza i dotyczy przede wszystkim kory głębokiej – obszaru, gdzie zlokalizowane są limfocyty T. Chorzy wykazują obniżoną zdolność do zwalczania zakażeń, lecz jest to wybiórcze i dotyczy głównie zakażeń wirusowych i pasożytniczych. Być może dlatego, że utrzymuje się dobra aktywność komórek NK i przeciwbakteryjna obrona makrofagów.

Agammaglobulinemia sprzężona z chromosomem X (agammaglobulinemia Brutona)

Ujawnia się po upływie 6 miesiąca życia, kiedy organizm pozbawiony jest przeciwciał pochodzących od matki. Przyczyną choroby są mutacje pojedynczego genu znajdującego się na chromosomie X, kodującego kinazę tyrozynową, która jest niezbędna do powstania dojrzałych limfocytów B. Charakteryzuje się brakiem limfocytów B mających receptory immunoglobulinowe i komórek plazmatycznych. Obraz węzłów chłonnych wykazuje brak ośrodków rozmnażania z prawidłowo ukształtowaną strefą grasiczozależną. W obrazie klinicznym dominują objawy ciężkich nawracających zakażeń bakteryjnych układu oddechowego.

Ciężki złożony niedobór odporności

Stanowi grupę uwarunkowanych genetycznie schorzeń o odmiennej patogenezie, ale o podobnym obrazie klinicznym wynikającym z braku czynności limfocytów zarówno T, jak i B. Klasyczną postacią schorzenia jest agammaglobulinemia typu szwajcarskiego, u podłoża której leżą zaburzenia dojrzewania i różnicowania komórek macierzystych limfopoezy. Ciężki złożony niedobór odporności może być również spowodowany niedoborem deaminazy adenozynowej, której przyczyną jest mutacja lub

delecja w obrębie jej genu. Enzym ten jest niezbędny do katalizowania reakcji przemiany adenozyny do inozyny i choć jego obecność wykazano we wszystkich komórkach organizmu, to największą jego aktywność stwierdza się w limfocytach. Brak enzymu powoduje gromadzenie się w tymocytach toksycznych metabolitów hamujących syntezę DNA. Obraz kliniczny jest zróżnicowany. Ciężki złożony niedobór odporności może dotyczyć także mutacji w obrębie łańcucha γ dla receptora IL-2, czego skutkiem jest eliminacja szpikowych prekursorów limfocytów T.

Wtórne deficyty immunologiczne

Nabyte (wtórne) niedobory odporności są najczęściej spotykanymi zaburzeniami układu odpornościowego i dotyczą głównie zaburzeń funkcjonowania limfocytów T i komórek żernych. Głównymi przyczynami wtórnych deficytów immunologicznych są:

- **Choroby infekcyjne**, zarówno wirusowe (np. odra), jak i bakteryjne (np. gruźlica). Najlepiej znaną, a zarazem najgroźniejszą taką chorobą jest AIDS (zespół nabytego niedoboru odporności) wywołany infekcją wirusem HIV. Wirus wykazuje powinowactwo do limfocytów Th, makrofagów i komórek dendrytycznych. Po wniknięciu do cytoplazmy następuje przepisanie materiału genetycznego wirusa z RNA na DNA, który może zostać wbudowany do genomu komórki gospodarza. Do efektywnej transkrypcji i integracji wirus wymaga aktywowanego limfocytu T. Drastyczne spustoszenie układu immunologicznego spowodowane jest szerokim wachlarzem oddziaływań wirusa: 1) komórka, w której doszło do internalizacji genomu wirusa, staje się „niewidzialna" dla układu odpornościowego, 2) w zakażonym limfocycie T pojawiają się wirusowe białka powierzchniowe, które inicjują proces apoptozy jakichkolwiek komórek wchodzących w interakcje z zakażonym limfocytem, 3) następuje eliminacja limfocytów pamięci oraz 4) destrukcja mikrośrodowiska narządów limfatycznych.
- **Działania medyczne**, czasem celowe, ale najczęściej niezamierzone. Celowe hamowanie funkcji układu odpornościowego spotyka się w leczeniu chorób autoimmunologicznych oraz w wyniku leczenia immunosupresyjnego po przeszczepach tzw. allogenicznych. Leczeniem, w którym efekt immunosupresji jest silnym i wybitnie niepożądanym zjawiskiem, jest leczenie chemioterapeutyczne i radioterapeutyczne stosowane w chorobach nowotworowych.
- **Niedożywienie białkowo-energetyczne oraz niedobory pierwiastków** (selen, miedź, magnez, żelazo), **witamin** (A, C, D, B_6, kwas foliowy).
- **Starzenie się układu immunologicznego**, którego konsekwencją są zaburzenia w funkcjonowaniu odpowiedzi komórkowej oraz humoralnej. Wykazano, że u osób po 70 roku życia ogólna liczba limfocytów T stopniowo spada, a ponadto zostają zaburzone proporcje liczebności poszczególnych subpopulacji limfocytów T. Nieprawidłowe funkcjonowanie odpowiedzi humoralnej u osób starszych spowodowane jest między innymi obniżoną liczebnością limfocytów B, spadkiem miana naturalnych przeciwciał i wzrostem stężenia IgG w surowicy.
- W warunkach **stresu** obserwuje się odchylenia w zakresie wskaźników odpowiedzi komórkowej, tzn. następuje spadek liczby limfocytów i zaburzenia ilościowe ich subpopulacji, obniżenie aktywności komórek NK oraz zaburzenia fagocytozy.

Choroby autoimmunizacyjne

Choroby autoimmunizacyjne stanowią grupę chorób, w których patogenezie układ immunologiczny organizmu niszczy własne komórki i tkanki. Choroby te mogą być swoiste dla danego narządu (np. cukrzyca, gdzie narządem docelowym jest trzustka) lub uogólnione (toczeń rumieniowaty układowy), atakujące wiele narządów. U podłoża chorób autoimmunologicznych leżą głównie zaburzenia procesów generujących zjawisko tolerancji immunologicznej (zob. wyżej). Autoagresja może być także zależna od czynników zakaźnych (teoria molekularnej mimikry, czyli podobieństwo antygenów wirusa/bakterii do autoantygenów), wieku (autoprzeciwciała są częściej spotykane u starszych osób, co jest prawdopodobnie spowodowane zaburzeniami w regulacji układu odpornościowego) oraz płci (występowanie chorób autoimmunizacyjnych jest znacznie częstsze u kobiet).

Przykłady chorób autoimmunizacyjnych przedstawiono w tabeli 12.7.

Wykaz skrótów

ADCC – cytotoksyczność komórek zależna od przeciwciał. Komórki mające receptor Fc (np. makrofagi) zabijają komórki, których powierzchnia związała przeciwciała.

APCs – (*antigen presenting cells*) komórki prezentujące antygen.

MAC (*membrane attacking complex*) – kompleks atakujący błonę komórkową.

Tabela 12.7 Przykłady chorób autoimmunizacyjnych

Jednostka chorobowa	Antygen drobnoustroju	Antygen ludzki	Lokalizacja procesu chorobowego
Zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych	lipopolisacharyd *Neisseira meningitidis*	antygeny powierzchniowe z jednostką laktonotetrozową (erytrocyty, limfocyty, granulocyty)	opony mózgowo-rdzeniowe
Choroba Hashimoto	białko wirusa zapalenia wątroby (HCV)	tyreoglobulina, peroksydaza tarczycowa	tarczyca
Nużliwość mięśni	polipeptyd *E. coli, K. pneumoniae, P. vulgaris, Y. enterocolitica*	receptor dla acetylocholiny	synapsy nerwowo-mięśniowe
Toczeń układowy rumieniowaty	jądrowe białko EBNA wirusa Epsteina-Barr	DNA, antygen rybonukleoproteinowy RNP, antygeny Ro i La w jądrowych i cytoplazmatycznych rybonukleinach, histony	skóra, błony śluzowe i surowicze, stawy, nerki, ośrodkowy układ nerwowy, krew
Stwardnienie rozsiane	polimeraza wirusa Epsteina-Barr	zasadowe białko mielinowe człowieka	ośrodkowy układ nerwowy
Cukrzyca typu 1	białko P2C wirusa Coxsackie	dekarboksylaza kwasu glutaminowego (GAD), wysepki fosfatazy tyrozynowej	trzustka

MBL (*mannose binding lectin*) – białko wiążące mannozę.
PAMP (*pathogen asssociated molecular patterns*) – molekularne wzorce występujące na patogenach.
PRR (*pattern recognition receptors*) – receptory rozpoznające wzorce molekularne.
TLRs (*toll-like receptors*) – Toll-podobne receptory.

Piśmiennictwo

Bojarska-Junak A., Tabarkiewicz J., Roliński J.: *Komórki NKT: powstawanie, mechanizmy i efekty działania*. Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej 2013; 67: 65–78.

Feliksbrot M.E., Król M.A., Dwilewicz-Trojaczek J.: *Limfopoeza komórek B u człowieka*. Advances in Clinical and Experimental Medicine 2005; 14: 1033–1040.

Gołąb J., Jakóbisiak M., Lasek W., Stokłosa T.: *Immunologia*. Wydawnictwo Naukowe PWN. Warszawa 2009, wyd. 5.

Hammond K.J.L., Godfrey D.I.: *NKT cells: potential targets for autoimmune disease therapy?* Tissue Antigens 2002; 59: 353–363.

Jasiulewicz A., Lisowska K.A., Bryl E., Witkowski J. M.: *Rola limfocytów B w mechanizmach patogenezy wybranych chorób*. Forum Medycyny Rodzinnej 2011; 5: 37–46.

Kościelak J.: *Komórki NKT, CD1 I lipidy: ostatnio odkryte ramię układu odpornościowego otwiera nowe możliwości leczenia nowotworów i chorób na tle autoimmunologicznym*. Acta Hematologica Polonica 2000; 31: 229–239.

Maślanka T.: *Komórki regulatorowe z populacji limfocytów $CD4^+$*. Medycyna Weterynaryjna 2010; 66: 827–832.

Niedźwiecka-Rystwej P., Tokarz-Deptuła B., Deptuła W.: *Charakterystyka subpopulacji limfocytów T*. Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej 2013; 67; 371–379.

Reinicke A.T., Omilusik K.D., Basha G. i wsp.: *Dendritic cell cross-priming is essential for immune responses to Listeria monocytogenes*. PLOS ONE 2009; 4: e7210.

Takahama Y.: *Journey through the thymus: stromal guides for T-cell development and selection*. Nature Reviews. Immunology 2006; 6: 127–135.

van Kaer L.: *Regulation of immune responses by CD1d-restricted natural killer T cells*. Immunologic Research 2004; 30: 139–153.

Wu L. and Van Kaer L.: *Natural killer T cells and autoimmune disease*. Current Molecular Medicine 2009; 9: 4–14

Żeromski J., Samara H., Mozer-Lisewska I.: *Komórki dendrytyczne: czy wszystko o nich wiemy?* Postępy Biologii Komórki 2007; 34: 541–556.

ROZDZIAŁ 13

Kancerogeneza

Jerzy Kawiak, Maciej Zabel

HASŁA

Podstawowe zaburzenia w komórce nowotworowej

Regulacje proliferacji i procesu apoptozy są w komórkach nowotworowych zaburzone. Zmiany regulacji są spowodowane zmianami genetycznymi: niektóre protoonkogeny przekształcają się w onkogeny, a niektóre geny supresorowe nowotworów tracą ekspresję bądź funkcję. Powoduje to stałe wytwarzanie w komórce białek indukujących podziały (produkty onkogenów) oraz niedobór białek hamujących ten proces (produkty genów supresorowych).

Brak obrony immunologicznej przeciw nowotworowi, tolerancja immunologiczna

Komórki nowotworu wymykają się spod kontroli układu immunologicznego. Zwykle nie zdajemy sobie sprawy z tego, że choroba nowotworowa może rozwijać się **tylko** wtedy, gdy funkcjonowanie układu odpornościowego zostaje zaburzone. Choroba nowotworowa jest więc podwójną chorobą, która dotyczy pojawienia się komórek nowotworowych oraz wywołanych przez nie zaburzeń funkcji układu obronnego. Komórki nowotworowe mogą mieć niesprawny układ przygotowania antygenów w proteasomach lub mogą utracić zdolność do prezentacji antygenu z powodu niskiej ekspresji MHC I klasy. Nowotwór może ponadto zyskać zdolność do wytwarzania czynników immunosupresyjnych. Przyczynia się to do zjawiska tolerancji, gdy układ immunologiczny nie odpowiada bądź odpowiedź na pojawiające się komórki nowotworowe jest niewystarczająca.

Klonalny rozwój nowotworu

Podczas kancerogenezy zmiany genetyczne zachodzą w komórce 4–5 razy, zanim przekształci się ona w komórkę złośliwą.

Nowotwory łagodne i złośliwe

Nowotwory, których komórki namnażają się i przeżywają nadmiernie długo, ale pozostają skupione w miejscu pierwotnego pojawienia się komórki transformowanej, nazywa się nowotworami łagodnymi. Gdy jednak komórki zyskują zdolność przedostawania się do naczyń krwionośnych lub limfatycznych oraz tworzenia przerzutów, wówczas są to nowotwory złośliwe. Przykładem jest rozwój raka okrężnicy u człowieka.

Onkogeny, onkogeny wirusowe

Onkogen jest to zmutowany gen kodujący białko kierujące komórkę do podziału. Onkogeny pierwotnie wykryto w retrowirusach onkogennych. Okazało się, że onkogeny te nie są wykorzystywane przez wirusy do replikacji, mogą być natomiast przez nie przenoszone do komórki, powodować ich transformację nowotworową.

Powstawanie onkogenów w komórkach niezakażonych retrowirusem

Onkogeny mogą powstawać z protoonkogenów przez mutacje albo rearanżacje DNA. Jest kilka przyczyn powstawania onkogenów w komórkach niezakażonych retrowirusem. Są nimi: mutacje punktowe, duże homozygotyczne delecje, translokacje chromosomowe, metylacje cytozyny, amplifikacja genu, czyli jego powielenie. W komórkach nowotworowych może też pojawić się ekspresja genu telomerazy.

Geny supresorowe nowotworów

Geny, które hamują proliferację komórek. Obecność jednego prawidłowego allelu genu supresorowego w komórce wystarcza, by nie miała ona charakteru nowotworowego. Utrata drugiego allelu powoduje natomiast brak białka hamującego cykl komórkowy, co przyczynia się do transformacji komórki w nowotworową.

Leczenie nowotworów

Leczenie nowotworów – zabieg chirurgiczny i napromienianie – jest na ogół skuteczne wtedy, gdy guz został wcześnie rozpoznany. Pozostawione po tych zabiegach komórki nowotworu mogą dać początek nawrotowi guza. Chemioterapia polega na podawaniu choremu substancji hamujących wzrost nowotworu. Niepożądanym skutkiem leczenia chemioterapeutykami jest zmniejszenie odporności chorego na zakażenia bakteryjne i wirusowe. Możliwe jest również leczenie chorego metodami immunologicznymi, ale tylko wtedy, gdy na początku leczenia masa guza nowotworowego jest mała.

Podstawowe zaburzenia w komórce nowotworowej

Podstawowym zaburzeniem prowadzącym do powstania nowotworu jest stała, nieregulowana proliferacja komórek oraz większa odporność komórek na czynniki powodujące ich śmierć. *In vivo* zarówno podziały, jak i śmierć poszczególnych komórek regulowane są tak, by było to optymalne dla całości organizmu. Komórki nowotworowe nie odpowiadają natomiast w sposób właściwy na płynące od innych komórek organizmu sygnały regulujące proliferację i dzielą się, a potem przeżywają w sposób niekontrolowany. Te nabyte przez komórki nowotworowe zaburzenia powodują, że liczba komórek nowotworowych stopniowo się zwiększa. Utrata zdolności kontrolowania wzrostu i śmierci, którą przejawiają komórki nowotworowe, jest następstwem procesu nazywanego **transformacją nowotworową**. Transformacja nowotworowa jest skutkiem nagromadzenia w ciągu wielu lat **zmian genetycznych** w DNA komórek. Sprzyja temu **niestabilność genomu** komórek transformowanych nowotworowo. Takie DNA komórek nowotworowych koduje nieprawidłowe RNA informacyjne (mRNA) oraz nieprawidłowe białka. Zmienione białka tracą funkcję albo wykazują nadmierną bądź nieprawidłową aktywność.

Zmiany genetyczne w komórkach podczas kancerogenezy dotyczą głównie trzech grup genów:
- **protoonkogenów**, które kodują białka będące w komórce drogą przekazywania sygnału do proliferacji; zmutowane protoonkogeny nazywa się **onkogenami**,
- **genów supresorowych nowotworów**; geny te kodują białka, które hamują przekazywanie wewnątrz komórki sygnału do podziału, hamują więc proliferację komórek,
- **genów regulujących apoptozę komórek.**

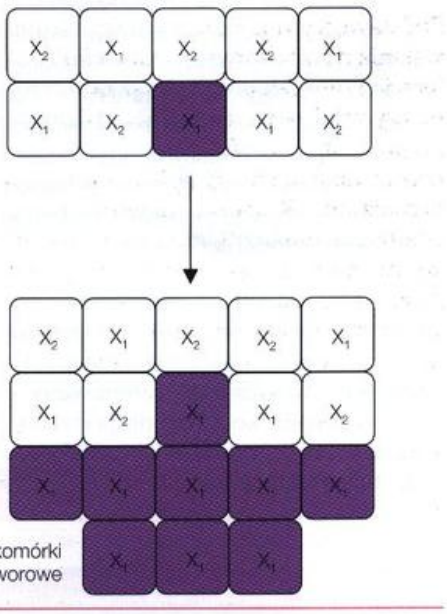
Brak obrony immunologicznej przeciw nowotworowi, tolerancja immunologiczna

Zasadniczą zmianą podczas pojawiania się komórek nowotworowych jest ich zdolność do „oszukania" komórek układu odpornościowego. Dobrze ilustrują to zjawisko doświadczenia na zwierzętach. Wykonano implantacje do myszy komórek ostrej limfatycznej białaczki, które miały takie same cząsteczki zgodności tkankowej (MHC klasy I), jak komórki myszy. Już 10 komórek białaczki wszczepionych zwierzęciu powodowało śmierć wszystkich myszy z powodu białaczki. Odpowiednie leczenie myszy szczepieniem komórkami białaczki

z indukowaną w nich apoptozą (autoszczepionka) pozwalało na wyleczenie 60% zwierząt. Oznacza to, że udało się tym sposobem wywołać taką własną odpowiedź immunologiczną u zwierząt chorych, w wyniku której wszystkie komórki białaczki zostały usunięte. Podobną metodę zastosowano u chorych na przewlekłą białaczkę limfatyczną B-komórkową. Pobrano im krew, izolowano z niej leukocyty, wśród których było dużo komórek białaczkowych. Leukocyty w probówce napromieniono dawką wywołującą apoptozę komórek białaczki i podawano je śródskórnie w ramię chorego. U 2/3 chorych obserwowano zatrzymanie choroby na pewien okres i u części zmniejszenie liczby krążących limfocytów białaczkowych bez indukcji u chorych objawów niepożądanych. W przewlekłej chorobie nowotworowej nie udaje się jednak usunięcie wszystkich komórek nowotworowych, chociaż zatrzymanie choroby na jakiś czas jest ważne. Brak wyleczenia jest spowodowany istotnym, wieloletnim uszkodzeniem funkcjonowania układu immunologicznego u chorych. Zwykle nie zdajemy sobie sprawy z tego, że choroba nowotworowa może rozwijać się **tylko** wtedy, gdy funkcjonowanie układu odpornościowego zostaje zaburzone. Choroba nowotworowa jest więc podwójną chorobą, która dotyczy pojawienia się komórek nowotworowych oraz wywołanych przez nie zaburzeń funkcji układu obronnego. Może to mieć również związek z zakażeniami wirusowymi, które zaburzając funkcje immunologiczne, mogą dodatkowo doprowadzić do schorzenia nowotworowego. Jednak nasze zachowanie jest także ważne. Odpowiednim badaniem sprawdzono, że u zdrowych osób palących papierosy w płucach jest znacznie obniżona liczba komórek obrony immunologicznej w porównaniu z osobami zdrowymi niepalącymi. Można więc sądzić, że w płucach komórki z onkogennymi mutacjami nie są na czas usuwane, co w końcu częściej prowadzi do raka płuca u osób palących.

Klonalny rozwój nowotworu

Nowotwór rozwija się najczęściej z pojedynczej, zmienionej komórki. Komórka ta daje klon komórek nowotworowych. Najprościej można wytłumaczyć to u kobiet, analizując chromosomy X (ryc. 13.1). Kobiety mają parę chromosomów X, z których jeden jest inaktywowany i staje się heterochromatynowym jeszcze w życiu zarodkowym. W jednych komórkach jest inaktywowany chromosom X_1 (X_1 od matki), a w innych – X_2 (X_2 od ojca), zachodzi to przypadkowo. Dlatego w prawidłowej tkance jest przypadkowe rozmieszczenie komórek z inaktywowanym chromosomem X_1 bądź X_2, komórki nowotworu mają natomiast inaktywowany tylko jeden z tych chromosomów, np. X_1 (ryc. 13.1). Przyjmuje się to za dowód klonalności komórek nowotworu, czyli pochodzenia wszystkich od jednej komórki zmienionej w kierunku nowotworowym. Po pierwszej zmianie genetycznej, sprzyjającej np. proliferacji komórek, w jednej z komórek klonu może dojść do nowej zmiany genetycznej. Daje to początek następnemu klonowi komórek nowotworowych o mniejszej niż poprzednio zależności od sygnałów regulacyjnych pochodzących z pozostałych komórek organizmu. Również w którejś z komórek tego wtórnego klonu może wystąpić następna mutacja i powstaje klon jeszcze bardziej niezależny, nieodpowiadający na sygnały od prawidłowych komórek. Takie pojawianie się kolejnych zmian genetycznych w komórkach (klonów komórek o coraz większej liczbie zmian genetycznych) zachodzi 4–5-krotnie. Nazywa się to progresją nowotworu. Progresja taka początkowo jest wolna i trwa latami. Doprowadza jednak w pewnym momencie do pojawienia się klonu komórek zupełnie niezależnego od sygnałów regulujących współpracę z innymi komórkami organizmu. Ko-



Rycina 13.1 Klonalny rozwój nowotworu, etap pierwszy, który jest następnie powtarzany. Przez X_1 albo X_2 zaznaczono komórki, w których jądrze jest heterochromatynowy, nieaktywny chromosom X_1 od matki albo X_2 od ojca. Komórki prawidłowe X_1 i X_2 są przypadkowo rozmieszczone w tkance, a komórki klonu nowotworowego, w tym przykładzie, wszystkie są X_1.

mórki nowotworowe opuszczają pierwotne miejsce wzrostu, rozsiewają się w organizmie, blokują obronę immunologiczną i stanowią coraz większą masę, co w końcu prowadzi do śmierci chorego.

Nowotwory łagodne i złośliwe

Budową, zmianami i oddziaływaniem komórek prawidłowych i zmienionych patologicznie w tkankach i narządach zajmuje się dziedzina nazywana histopatologią. Metodami histopatologicznymi można ocenić, czy jest to nowotwór złośliwy, czy łagodny. W przypadku chłoniaków i białaczek właściwą metodą dokładnej oceny jest cytometria przepływowa.

KLINIKA

Nowotwory, których komórki namnażają się i przeżywają nadmiernie długo, ale pozostają skupione w miejscu pierwotnego pojawienia, nazywa się **nowotworami łagodnymi**. Gdy komórki nowotworowe zyskują jednak zdolność do odrywania się z miejsca pierwotnego wzrostu i przedostawania do naczyń krwionośnych lub limfatycznych oraz tworzenia **przerzutów** w nowych miejscach, wówczas są to **nowotwory złośliwe**. Histopatolog rozpoznaje nowotwór łagodny bądź złośliwy na podstawie wyglądu komórek i ich jąder, oceny komórek metodami immunocytochemii oraz częstości podziałów komórek. Chorego z nowotworem łagodnym można wyleczyć chirurgicznym usunięciem guza, ale rozpoznanie „łagodności" musi być potwierdzone histopatologicznym badaniem cienkoigłowym okolicznych węzłów chłonnych, gdzie wcześnie mogą pojawić się przerzuty. Nakłucie cienką igłą węzła chłonnego pozwala otrzymać wystarczającą liczbę komórek do takiej oceny węzła.

Onkogeny, onkogeny wirusowe

Onkogenem określa się zmutowany gen kodujący białko kierujące komórkę do podziału. Białka onkogenów działają podobnie jak pedał gazu w samochodzie, tylko pedał gazu jest zablokowany i nie można go zwolnić. Komórki z onkogenem kontynuują wzrost nawet gdy nie otrzymują sygnału do wzrostu. Onkogeny pierwotnie wykryto w **retrowirusach** onkogennych (tab. 13.1). Okazało się, że onkogeny nie są wykorzystywane przez wirusy do replikacji, ale mogą być przez nie przenoszone. Onkogeny kodują białka biorące udział w drogach sygnalizacji prowadzącej do podziału komórki, lecz geny te nie poddają się prawidłowej regulacji (ryc. 13.2). Po wbudowaniu do genomu mogą też aktywować sąsiednie geny, ważne w regulacjach funkcji komórki. Powoduje to, że komórki zakażone retrowirusem przenoszącym onkogen dzielą się w sposób niekontrolowany przez inne komórki organizmu. Taka aktywność białek kodowanych przez onkogeny wynika z tego, że są wytwarzane: 1. w formie stale aktywnej lub 2. pojawiają się w komórkach, w których zwykle ich brak, lub też 3. są wydzielane w nadmiernej ilości. Komórka zakażona wirusem przenoszącym onkogen może stać się nowotworową, transformowaną wirusem onkogennym.

KLINIKA

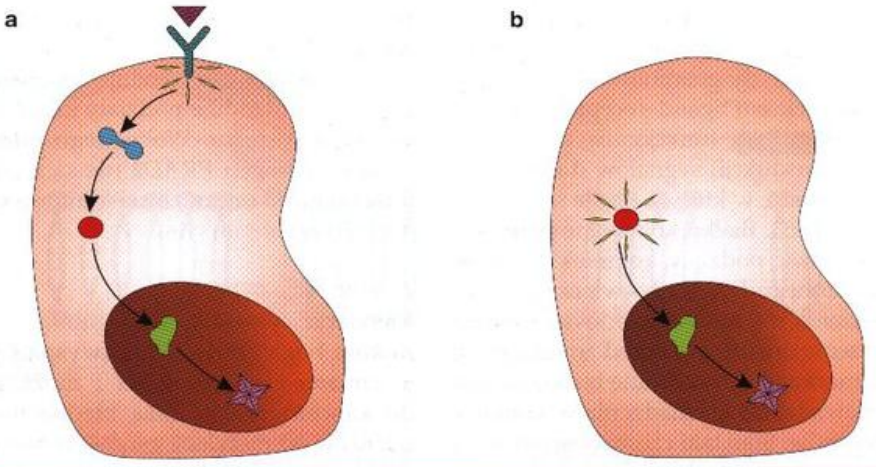
U ludzi wirus Epsteina-Barr (EBV) wywołuje chłoniaki, nowotwory limfocytów B. Nowotwory skóry, okolicy odbytu i narządów rodnych są wywoływane wirusem *papilloma* (HPV). Wirus indukuje m.in. raka szyjki macicy i można temu zapobiec szczepieniem we wczesnym okresie życia. Rak wątroby jest związany z wcześniejszym zakażeniem wirusem *hepatitis B* (HBV). Samo zakażenie wirusem onkogennym nie jest jednoznaczne z powstaniem nowotworu, ale duże prawdopodobieństwo pojawienia się nowotworu u takiej osoby powinno wzmóc czujność lekarza.

Powstawanie onkogenów w komórkach niezakażonych retrowirusem

Onkogeny mogą powstawać z **protoonkogenów** przez mutacje albo rearanżacje DNA. Po raz pierwszy wykazano to w przypadku raka pęcherza moczowego u człowieka. DNA otrzymany i oczysz-

Tabela 13.1 Wirusy onkogenne u człowieka

Nazwa wirusa	Nowotwór indukowany	Wielkość (kb)
Wirus *hepatitis B*	rak wątroby	3
Wirusy *papilloma*	rak szyjki macicy	8
Wirus Epsteina-Barr	rak nosogardzieli, chłoniak Burkitta	100–200



Rycina 13.2 Różnica między funkcjonowaniem białek leżących na drodze przekazywania sygnału do podziału lub sygnału blokującego apoptozę w komórce prawidłowej (**a**) oraz nowotworowej (**b**). Sygnał do podziału komórki albo do zablokowania apoptozy pochodzi od aktywowanego ligandem receptora w **a**, albo od jednego ze śródkomórkowych białek na drodze sygnałowej w **b.**

czony z wyciętego raka pęcherza wprowadzono do mysich prawidłowych komórek hodowanych *in vitro*. W ten sposób wywołano w pewnym odsetku mysich komórek transformację nowotworową. Z doświadczenia wyciągnięto wniosek, że nowotwór człowieka zawierał biologicznie aktywny onkogen. Od tego czasu przenoszenie onkogenów wraz z DNA, czyli **transfekowanie komórek onkogenami** *in vitro* jest standardową techniką badawczą, którą wykryto wiele funkcji onkogenów ludzkich nowotworów.

Genom komórek nowotworowych jest niestabilny, czyli stosunkowo często podlega zmianom. Jest kilka przyczyn powstawania onkogenów w komórkach niezakażonych wirusem (tab. 13.2). Są nimi:

- mutacje punktowe, gdy w obrębie DNA genu następuje zamiana zasady, np. zastąpienie G przez T,
- duże homozygotyczne delecje, czyli utrata dużych części jednego z pary chromosomów homologicznych,
- translokacje chromosomowe i powstanie genów fuzyjnych, nowych genów z dwóch niekompletnych genów prawidłowych,
- metylacje cytozyny w pozycji 5′ w CpG, regionie promotora genu bogatym w C i G, w tzw. wyspie CpG,
- amplifikacje genu, czyli jego powielenie.

Mutacje te zachodzą w ciągu wielu lat. Nie wszystkie komórki z pierwszą mutacją, a tylko pojedyncze zyskują mutację drugą i następne. Sprzyja temu, jak wspomniano, niestabilność genomu komórki, w której pojawi się kilka mutacji.

Mutacje punktowe

Mutacje punktowe mogą powstawać przez zastąpienie jednego nukleotydu innym. Przykładem mutacji punktowej *rasH* w raku pęcherza moczowego jest zamiana G na T w kodonach 12, 13 i 61 np. 12 GGC (Gly) → 12 GTC (Val). Powoduje to, że w odpowiednim miejscu białka w sekwencji aminokwasów walina pojawia się zamiast glicyny. Mutacje takie

Tabela 13.2 Mechanizmy powstawania onkogenów (o) i genów supresoriwych (gs)

Gen	Mechanizm powstawania	Nowotwory
rasH	o – mutacja punktowa	rak pęcherza moczowego, tarczycy
erbB	o – amplifikacja	rak pęcherza moczowego, sutka, jajników
myc	o – amplifikacja	rak sutka, płuca
PRAD1	o – translokacja chromosomowa	*adenoma* przytarczyc
BCR/ABL	gs – translokacja chromosomowa	białaczka szpikowa przewlekła
$p16^{INK4}$	gs – metylacja cytozyny	*melanoma*, rak płuca, chłoniaki
p53	gs – mutacja punktowa	rak jelita

mogą być wywołane chemicznymi kancerogenami i zachodzą np. w protoonkogenie *ras*, który koduje białka wiążące nukleotydy guaninowe (GTP, GDP), aktywowane kompleksem ligand–receptor w błonie komórkowej. Białka RAS funkcjonują na drodze przekazywania (transdukcji) sygnałów do podziału komórki. Innym genem, w którym częste są mutacje punktowe, jest gen *p53*. Białko kodowane przez ten gen może zablokować podziały komórek na okres naprawy uszkodzonego DNA albo włącza apoptozę, gdy uszkodzenia nie można naprawić, stanowi więc zabezpieczenie organizmu przed zmienionymi genetycznie komórkami. Zmutowane białko nie jest aktywne, co prowadzi do gromadzenia w komórce zmutowanych genów. Stan taki często obserwuje się w komórkach nowotworowych.

Duża delecja, czyli utrata części chromosomu

Duża delecja, czyli utrata części chromosomu, zdarza się w komórkach pod wpływem działania różnych uszkadzających DNA czynników, np. napromienienia. Duża delecja homologicznych części chromosomu może spowodować usunięcie ważnych dla funkcji komórki genów i zbliżenie genów zwykle oddalonych od siebie. Stwarza to możliwość zaburzeń zachowania się komórek, których większość ginie, ale niektóre nabywają skłonności do transformacji nowotworowej.

Translokacja chromosomowa

Jeszcze innym sposobem powstania onkogenu albo genu supresorowego jest translokacja chromosomowa. Translokacja jest wzajemną wymianą części dwóch chromosomów. Zwykle przy tej okazji jest tracona część materiału genetycznego. Przykładem efektu translokacji jest występujący w komórkach przewlekłej białaczki szpikowej (CML) chromosom Philadelphia. W tym przypadku gen tyrozynowej kinazy białkowej *abl* z chromosomu 9 zostaje przeniesiony na chromosom 22. Na chromosomie 22 powstaje **gen fuzyjny** kodujący fuzyjne białko BCR/ABL, w którym normalny N-koniec ABL jest zastąpiony sekwencją aminokwasów BCR. To nowe białko nie występuje w komórkach prawidłowych, stąd może służyć do odróżnienia komórek nowotworowych. Białko fuzyjne BCR/ABL ma kilka znanych funkcji. Jedną z nich jest zapobieganie śmierci komórek nowotworowych w procesie apoptozy. Dlatego komórki nowotworowe, mimo iż czasem mnożą się, nie umierają, lecz gromadzą się w coraz większej liczbie (choroba przewlekła).

Innym przykładem jest gen kodujący cyklinę D1, będący protoonkogenem, który może zostać przekształcony w onkogen *PRAD1* przez translokację chromosomową albo amplifikację genu (tab. 13.2). Onkogen koduje stale aktywną cyklinę D1, która powoduje podziały komórek bez udziału czynnika wzrostu. Wobec tego podziały komórki mającej onkogen *PRAD1* nie są regulowane przez inne komórki organizmu i komórki rosną w formie nowotworu.

Metylacja cytozyny

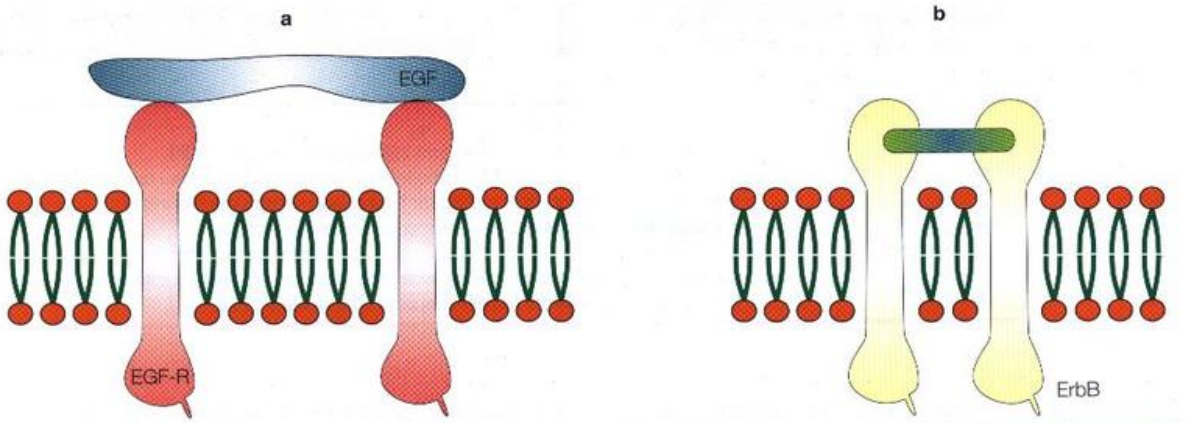
Metylacja cytozyny, szczególnie w regionie promotora bogatym w C i G (wyspa CpG), powoduje zmianę ekspresji genu i może przyczynić się do kancerogenezy. Taką błędną metylację trzeba odróżnić od metylacji genów, w których proces ten zachodzi normalnie, np. w genie *IGF2* na chromosomie 11p15.5.

Amplifikacja

Amplifikacja, czyli powielenie protoonkogenu, również prowadzi do powstania onkogenu. W ok. 14% nowotworów raka pęcherza moczowego komórki mają nadekspresję receptora nabłonkowego czynnika wzrostu (EGF-R). Prawidłowy gen, który koduje białkowy receptor nabłonkowego czynnika wzrostu (EGF-R), jest kinazą tyrozynową kontrolowaną przez wiązanie EGF. Związanie ligandu (EGF) przez receptor powoduje dimeryzację receptora, a to prowadzi do jego aktywacji i przekazania sygnału do podziału komórki. W komórkach raka nabłonka przejściowego pęcherza następuje amplifikacja tego genu wraz z delecją N-końcowej części białka, która zawiera miejsce wiązania EGF. Powoduje to powstanie onkogenu kodującego podwójny receptor, stale obecny w błonie komórkowej (ryc. 13.3) nazywany **ErbB** (HER2/new). ErbB jest niezdolny do wiązania EGF, ale cały czas pozostaje aktywny kinazowo i pobudza komórkę do podziałów nieregulowanych czynnikiem wzrostu. Obecność produktu tego onkogenu można również wykryć immunocytochemicznie w wielu nowotworach, np. proliferujących komórkach raka gruczołu krokowego o dużej złośliwości.

Geny supresorowe nowotworów

Gdyby kontynuować analogię do samochodu z zablokowanym pedałem gazu, to w rozpędzonym pojeździe można w tej sytuacji próbować zatrzymać go hamulcem. Hamulce komórek nazywa się **białkami supresorowymi**. Jak wiadomo, geny występują zwykle w dwóch kopiach. Jedna kopia



Rycina 13.3 Receptory błonowe EGF-R są wiązane przez ligand (EGF) w aktywne dimery (**a**) przekazujące w komórce sygnał do podziału. W komórce raka gen EGF-R ulega podwojeniu, a jego produkt (**b**), białko onkogenne ErbB, stale pobudza komórkę do podziałów.

pochodzi od ojca, a druga od matki. Mutacja aktywująca jeden z alleli i przekształcająca go w onkogen wystarcza do transformacji nowotworowej komórki i do zwiększenia jej proliferacji. Inaczej jest z genami, które kodują białka supresorowe hamujące proliferację komórek, a które nazywa się genami supresorowymi nowotworów. W tym przypadku obecność białek jednego prawidłowego genu supresorowego w komórce wystarcza do hamowania podziałów tak, by nie miały charakteru nowotworowego. Gdy jeden allel genu jest prawidłowy, a drugi nieprawidłowy, istnieje większe prawdopodobieństwo, że cały układ hamowania zawiedzie. Stan taki określa się heterozygotycznością alleli. Dotychczas nie poznano wielu genów supresorowych, a zaobserwowanie utraty drugiego allelu, czyli **utraty heterozygotyczności** (LOH – *loss of heterozygosity*) w proliferującej komórce nowotworowej, nasuwa podejrzenie, że w badanym fragmencie DNA jest zlokalizowany gen supresorowy (tab. 13.4). Dopiero utrata bądź mutacja inaktywująca produkt białkowy obu alleli genu supresorowego w komórce powoduje zmianę jej charakteru na nowotworowy.

Wykonane w latach sześćdziesiątych XX w. doświadczenie Harrisa polegające na tym, że komórka nowotworowa (tumorogenna) po fuzji z komórką prawidłową stawała się nienowotworowa, nie dawało się wytłumaczyć przez wiele lat (zob. też H. Harris: *Jądro i cytoplazma*, PZWL, Warszawa 1973). Obecnie można obserwację tę wyjaśnić obecnością w prawidłowej komórce genów supresorowych nowotworów, wprowadzanych podczas doświadczalnej fuzji do komórki nowotworowej. Geny te hamują podziały komórek, a więc również rozwój nowotworu.

Przykłady genów supresorowych nowotworów

W komórkach 50–70% nowotworów immunocytochemicznie obserwuje się duże stężenie **białka p53**, którego stężenie w komórkach prawidłowych jest niskie. Wiąże się to z mutacją genu *p53*. Najczęściej są to mutacje punktowe, ale nie dotyczą domeny oligomeryzacji okolicy cząsteczki białka p53, z którą mogą one łączyć się, tworząc di- lub tetramery. Zwykle mutacja p53 jest późnym zjawiskiem podczas kancerogenezy, poprzedzającym zdolność komórek nowotworowych do przerzutów.

Białko p53 jest czynnikiem transkrypcyjnym, który może indukować bądź hamować ekspresję wielu genów (tab. 13.3). Te aktywności białka p53 powodują, że jest jednym z głównych węzłów sieci, którą można przyrównać do sieci Internetu. Sieć ta kontroluje ważne dla życia komórki funkcje: podziały komórek, indukcję apoptozy, aktywację genów reperacji DNA. Są też niezależne od transkrypcji, ale mniej znane aktywności p53. Aktywne białko p53 jest zlokalizowane w jądrze komórkowym, a nieaktywne jego formy są w cytoplazmie.

Białko p53 tworzy w komórce dimery i tetramery; jego cząsteczki oddziałują przez domeny oligomeryzacji. Gdy oba allele *p53* są prawidłowe, to ich produkty białkowe, di- i tetramery są zbudowane z prawidłowych, aktywujących się jednostek. Jeżeli jeden z alleli *p53* jest zmutowany, a drugi prawidłowy, to pojawiają się w komórce nieaktywne tetramery białka, mieszane, zbudowane z prawidłowych i zmutowanych podjednostek (ryc. 13.4) gromadzących się w cytoplazmie w dużym stężeniu.

Białko p53 jest utrzymywane w komórce w małym stężeniu w wyniku oddziaływania z białkiem MDM2. W tym kompleksie p53 jest kierowane

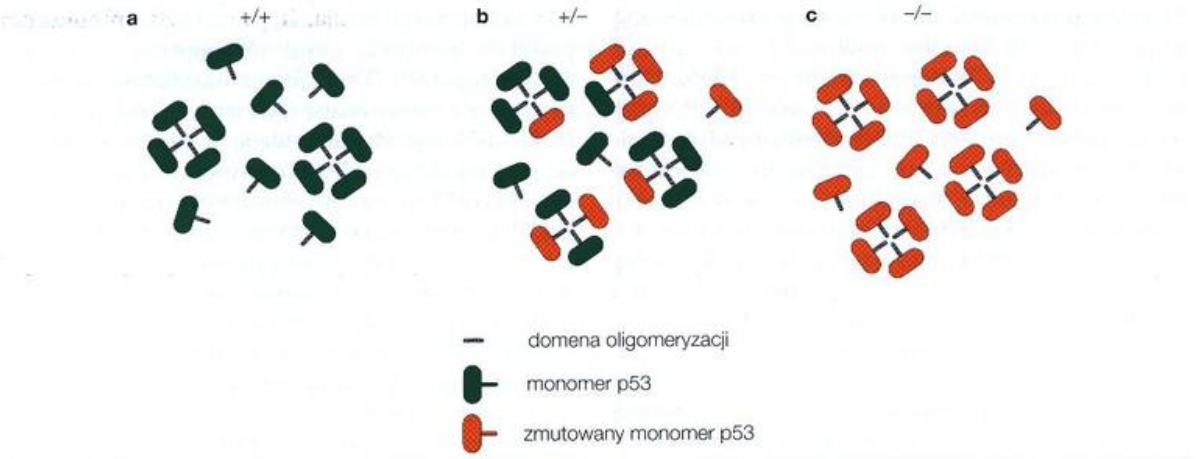
Tabela 13.3 Przykłady genów aktywowanych transkrypcyjnie przez białko p53

Gen	Aktywowanie/Zahamowanie	Funkcja kodowanego białka
MDM2	A	kompleks z p53, degradacja p53
$p21^{WAF1,CIP1}$	A	hamowanie cyklu komórkowego, kompleks z kinazą zależną od cyklin (CDK)
GAAD 45	A	wiązanie z PCNA i zatrzymanie cyklu komórkowego, wycinanie nukleotydów i reperacja DNA
Bax	A	w mitochondriach bierze udział w apoptozie indukowanej stresem komórkowym
Noxa, Bcl-2 homology3	A	w mitochondriach oddziałuje z Bcl-2, powodując włączenie apoptozy
BCL-2	Z	hamowanie apoptozy przez blokowanie uwalniania cytochromu c i Apaf-1 z mitochondriów
Fas	A	indukcja apoptozy na drodze receptorowej przez oddziaływanie z FasL

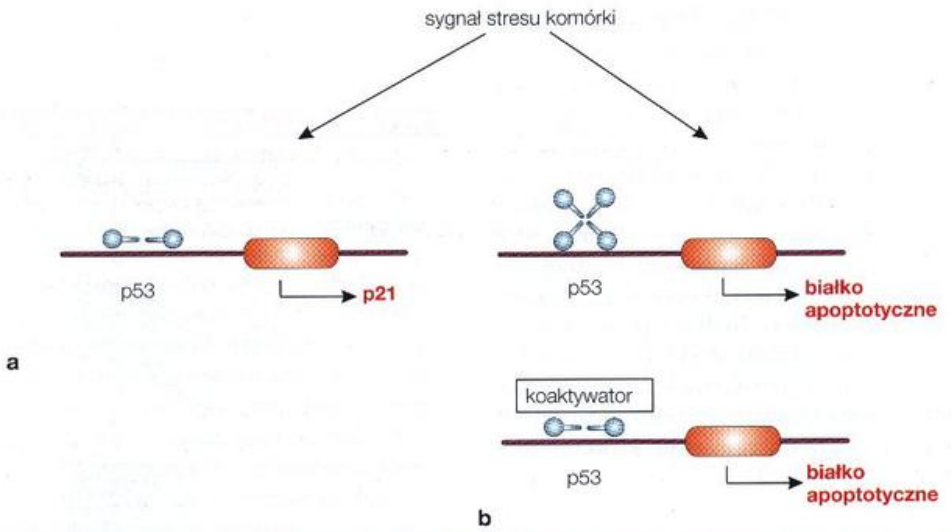
do degradacji w proteasomie. Działa tutaj ujemne sprzężenie zwrotne. Białko p53 zwiększa ekspresję MDM2, a to białko tworzy kompleks z p53, w którym p53 jest kierowane do degradacji. Stąd czas życia w komórce prawidłowego białka p53 jest krótki (połowiczny czas życia białka wynosi około 20 minut). Nieprawidłowe tetramery p53 nie tworzą kompleksu z MDM2, mają stąd długi okres życia w komórce i są łatwo wykrywane immunocytochemicznie.

Stres komórkowy (np. uszkodzenie DNA) prowadzi do zwiększenia stężenia p53 przez rozpad kompleksu z MDM2, które jest wtedy fosforylowane. Jedna z hipotez działania p53 w komórce zakłada, że przy niezbyt dużym wzroście stężenia p53 pojawiają się dimery hamujące cykl komórkowy (ryc. 13.5), gdyż dimery te aktywują geny biorące udział w zatrzymaniu cyklu i reperacji DNA (tab. 13.3). Gdy nie nastąpi naprawa DNA, stężenie p53 w komórce wzrasta dalej, pojawiają się tetramery p53 oraz dimery p53 związane z koaktywatorami oraz p53 wiąże się bezpośrednio w miejscach uszkodzonego DNA. Te formy p53 aktywują transkrypcję białek proapoptotycznych, co sprzyja włączeniu apoptozy prowadzącej do eliminacji komórki z uszkodzonym DNA. Jeżeli w komórce występuje zmutowany p53, to proces włączenia apoptozy jest mniej prawdopodobny. Komórki nowotworowe ze zmutowanym p53, mimo licznych uszkodzeń DNA, dzielą się dalej. Gdy kilka hamulców zawodzi jednocześnie, samochodu zatrzymać nie można.

Komórki mają kilka hamulców (pedał hamulcowy, hamulec ręczny), podobnie jak samochód. Jest wiele genów supresorowych, z których kilka wymieniono w tabeli 13.2. Często nie są one dobrze poznane, a znana jest tylko ich pozycja w chromo-



Rycina 13.4 Tworzenie oligomerów przez białko p53 w komórkach z prawidłowym białkiem (**a**) oraz ze zmutowanym białkiem kodowanym na jednym (**b**) bądź obu allelach (**c**). W (**a**) powstają prawidłowe oligomery p53, w (**b**) funkcja p53 jest upośledzona, mniejsza jest szansa włączenia apoptozy, a genom jest niestabilny, w (**c**) jest całkowita utrata funkcji p53 hamowania nowotworzenia (wg Hann B.C., Lane D.P.).



Rycina 13.5 Jedna z hipotez funkcjonowania białka p53. Stres komórkowy (**a**) prowadzi do powstania dimerów p53, aktywujących transkrypcję genów p21, GAAD45, wpływających na zatrzymanie cyklu komórkowego i naprawę DNA. Silny stres komórkowy (**b**) spowodowany napromienianiem, lekami, toksynami prowadzi do apoptozy. Pojawiają się tetramery p53 lub dimery związane z cząsteczkami koaktywatora, co aktywuje ekspresję białek uczestniczących w apoptozie, stąd zwiększa się szansa na jej włączenie.

somie (tab 13.4). Białkiem supresorowym jest również p21, przedstawiciel całej rodziny białek p21 (białka p21, p27, p57). **Białko p21** jest inhibitorem kompleksów cyklin i kinaz zależnych od cyklin: CDK4/D, CDK6/D i CDK2/E. Wspomniane kinazy, jak wiadomo, tworzą kompleks z cyklinami. Kompleksy te regulują wchodzenie komórki w cykl i rozpoczęcie replikacji DNA. Ekspresja p21 jest regulowana białkiem p53. Jak już wspomniano, kinazy CDK w kompleksie z cyklinami fosforylują białko retinoblastoma (RB) podczas fazy G1, co powoduje uwolnienie innego jeszcze czynnika transkrypcyjnego E2F koniecznego do proliferacji komórki. Utrata białka p21 powoduje stałą, nieregulowaną syntezę DNA.

Supresorowe działanie jeszcze jednego z genów supresorowych, wykrytego w 1993 r. na chromosomie 9p21, będzie omówione niżej. Gen koduje białko p16, które wiąże się z enzymami aktywnymi w cyklu komórkowym, kinazami zależnymi od cyklin (CDK). Wyniki badania oddziaływania CDK4 i CDK6 sugerują, że **p16^{INK4}** jest inhibitorem

Tabela 13.4 Częstość występowania utraty heterozygotyczności (LOH) w raku prostaty u mężczyzn przed leczeniem (A) i po leczeniu (B) (wg Lati A. et al. 1996; Deubier D. A. et al. 1997; Gher M. L. et al. 1996)

Locus utraty*	Występowanie (%)	
	A	B
7q	46	–
8p	53–58	80
10q	33	50
13q	53	75
16q		55
17q	61	–
17p	–	50
18q	39	–

* Locus utraty znajduje się na jednym z ramion chromosomu określonego numerem chromosomu i jego ramieniem (q – ramię długie, p – ramię krótkie).
Komentarz: Obserwuje się większą częstość LOH po leczeniu wtedy, gdy LOH występuje przed leczeniem i po leczeniu. Prawdopodobnie chodzi o wczesną utratę genów supresorowych podczas kancerogenezy. Inne geny supresorowe, zlokalizowane np. w 16q, 17p, były tracone późno, podczas leczenia.

tych kinaz białkowych. Białko, takie jak p16, które hamuje aktywność kinaz zależnych od cytokin, jest supresorem hamującym podział komórki. Brak obu alleli *p16* albo inaktywacja kodowanego tym genem białka supresorowego, występująca w komórkach nowotworowych, powoduje natomiast nieregulowane podziały komórki i jej transformację nowotworową. Wyciszenie genu *p16*, brak jego transkrypcji, zachodzi pod wpływem błędnej metylacji cytozyny i nie jest wyjątkowym zjawiskiem w nowotworach (tab. 13.4). Białko p16 jest jednym z członków większej rodziny, w skład której wchodzą też białka p15, p18, p19. Geny kodujące te białka są również zlokalizowane na chromosomie 9, w miejscu 9p21, czyli na ramieniu krótkim tego chromosomu.

Telomery

Od dawna zastanawiano się, dlaczego zdrowe komórki dzielą się ograniczoną liczbę razy, a komórki nowotworowe mogą dzielić się bez końca, czyli są nieśmiertelne. Jedną z przyczyn takiego zachowania się komórek nowotworowych jest zdolność odbudowywania telomerów. Telomery występują na końcach chromosomów i zabezpieczają je przed rozpadem lub łączeniem się z innymi chromosomami. Po każdym podziale komórki zostają sukcesywnie skracane. U człowieka telomery wystarczają na ok. 70 podziałów. Uważa się, że to częściowo wyjaśnia, dlaczego musimy się starzeć i umierać. Enzym zwany **telomerazą** odbudowuje telomery. Telomeraza jest odwrotną transkryptazą regulującą długość telomerów. W warunkach prawidłowych telomeraza jest wytwarzana tylko w okresie życia płodowego i nie jest obecna w prawidłowych komórkach po urodzeniu. Obecność telomerazy wykazano natomiast w wielu komórkach nowotworowych, co tłumaczy ich nieśmiertelność. Zahamowanie wytwarzania telomerazy w hodowanych poza ustrojem komórkach nowotworowych powoduje, że nieśmiertelne dotąd komórki wkrótce giną. Uaktywnienie genów telomerazy w hodowanych komórkach prawidłowych prowadzi natomiast do odbudowania telomerów; komórki te mogą dzielić się wielokrotnie więcej razy. Myszy, u których doświadczalnie zablokowano gen telomerazy, żyją krócej, są słabsze, a w szóstym pokoleniu stają się bezpłodne. Ponadto, co trudno obecnie wytłumaczyć, częściej zapadają na różne nowotwory. Znaczenie telomerazy jest więc bardziej złożone niż pierwotnie sądzono.

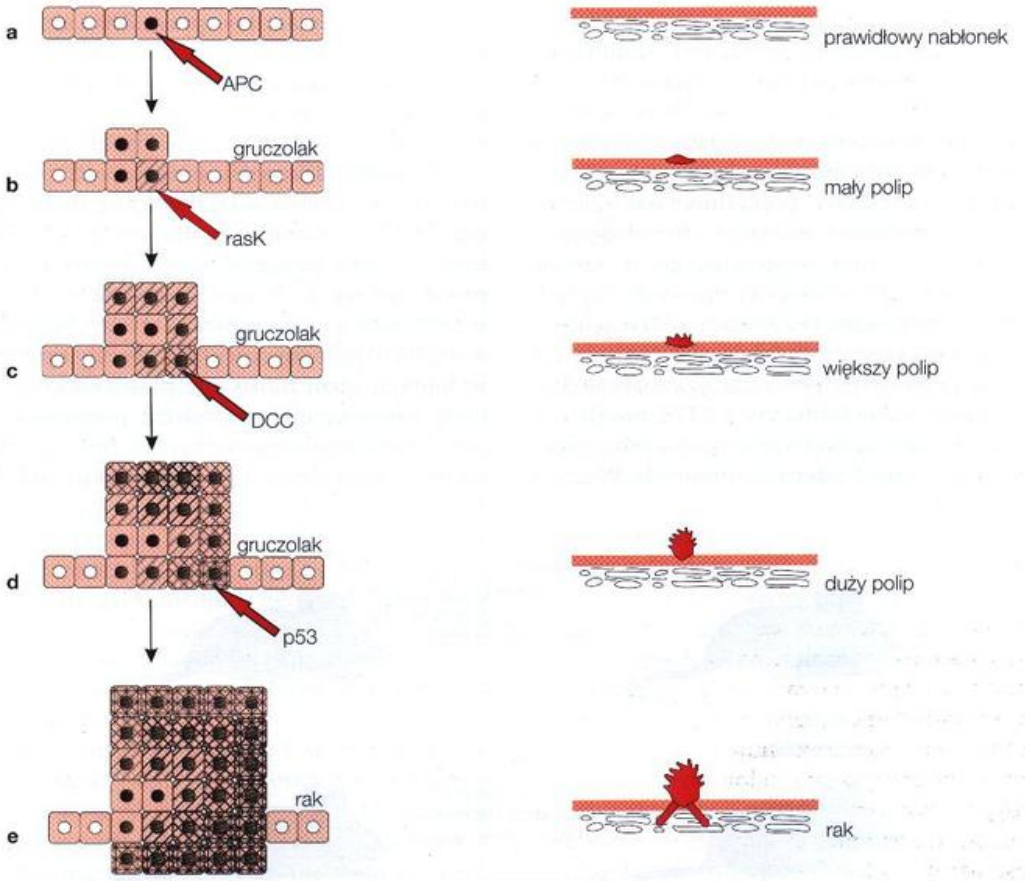
Przykład rozwoju nowotworu złośliwego

KLINIKA

Jednym z najlepiej poznanych przykładów dokumentujących stopniowy rozwój nowotworu jest **rak okrężnicy**. Nowotwór stosunkowo łatwo można obserwować makroskopowo (endoskopia), a pobrane ze zmian wycinki można ocenić mikroskopowo i metodami biologii molekularnej celem wykazania zmian genetycznych. Stwierdzono, że aby doszło do rozwoju raka okrężnicy, muszą zostać zmienione przynajmniej cztery geny. Są to geny: supresorowe *APC* (*adenomatous polyposis coli* – gruczolakowata polipowatość jelita grubego), *DCC* – jednego z białek adhezyjnych grupy IgCAM, gen białka p53 oraz protoonkogen *rasK*. Białka kodowane przez te geny pełnią istotne funkcje. APC jest białkiem związanym z kateninami, a DCC pełni ważną rolę w oddziaływaniach międzykomórkowych nabłonka. Białko ras należy do białek G i uczestniczy w aktywacji innych protoonkogenów, np. *fos*. Białko p53 reguluje proces naprawy uszkodzonego DNA oraz włączanie apoptozy w komórkach. W pierwszym etapie rozwoju raka okrężnicy występują zmiany w genie *APC*, co powoduje, że komórka zaczyna dzielić się częściej i powstaje mały polip (ryc. 13.6 **a** i **b**). Potwierdzeniem funkcji tego genu może być obserwacja jego mutacji we wrodzonej polipowatości jelita grubego, co usposabia do powstania nowotworu jelita grubego. W drugim etapie zostaje uszkodzony gen *rasK*, co prowadzi do powiększenia się polipa (ryc. 13.6 **c**), którego dalszy rozrost jest spowodowany uszkodzeniem genu *DCC* (ryc. 13.6 **d**). W ostatnim etapie dochodzi do mutacji genu *p53* i wtedy nowotwór zyskuje cechy złośliwego raka naciekającego okoliczne tkanki i dającego przerzuty (ryc. 13.6 **e**). W komórkach nowotworowych obserwuje się też większą liczbę transporterów GLUT (s. 118). Glikolityczny metabolizm w tych komórkach jest jedną z charaterystycznych cech.

Brak obrony immunologicznej przeciw nowotworowi – tolerancja immunologiczna

W schorzeniach nowotworowych obserwuje się nie tylko zmienioną reaktywność i antygenowość komórek nowotworowych spowodowaną pojawieniem się w nich nowych białek, ale również



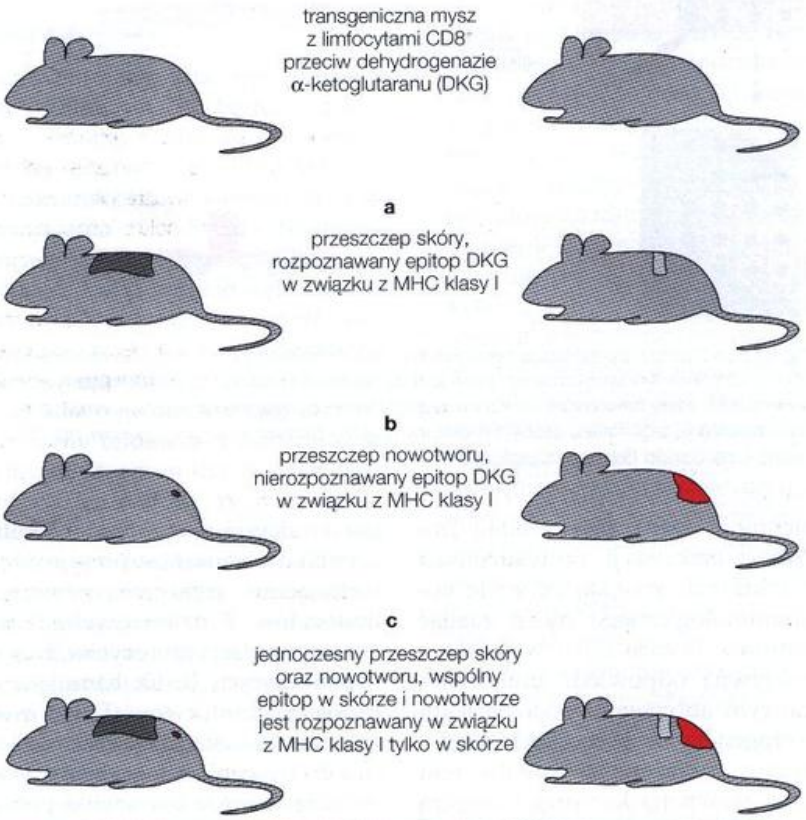
Rycina 13.6 Klonalny rozwój nowotworu na przykładzie raka okrężnicy wywodzącego się z komórek nabłonkowych. Kolejne uszkodzenie zaznaczonych genów w komórkach nowotworowych prowadzi do powstania nowego klonu o silniejszej proliferacji (*panel lewy*), co powoduje stopniowe zwiększenie masy nowotworu i w końcu zezłośliwienie objawiające się naciekaniem w głębsze warstwy okrężnicy. Prawdopodobieństwo powstania tego raka u osoby z wrodzonym uszkodzeniem któregoś z genów, np. *APC*, jest większe, gdyż wystarczą 3 mutacje, a nie 4, jak u osób bez uszkodzenia genu.

zmienioną obronę montowaną przez układ immunologiczny. Mimo obserwacji prowadzonych głównie *in vitro*, z których wynika, że wiele komórek układu immunologicznego może zabijać komórki nowotworowe, *in vivo* tylko wyjątkowo obserwuje się efektywną odpowiedź immunologiczną przeciw nowym antygenom pojawiającym się podczas kancerogenezy w komórkach nowotworowych. Antygeny związane z nowotworem zwykle pojawiają się wewnątrz komórek i czasem ich epitopy nie są prezentowane na powierzchni komórki, nie dają sygnału zagrożenia. Przyczyn może być kilka. Komórki nowotworu mogą wymykać się spod kontroli układu immunologicznego z powodu niesprawnego przygotowania antygenu w proteasomach lub mogą utracić zdolność prezentacji antygenu wynikającą z niskiej ekspresji MHC klasy I. Ponadto zarówno nowotwór, jak i otaczające go tkanki mogą zyskać zdolność wytwarzania czynników immunosupresyjnych, np. białka TGF-β hamującego efektywną stymulację, szczególnie limfocytów T dziewiczych. Pojawia się również liczna populacja limfocytów Treg (regulatorowych) produkujących IL-10, hamująca odpowiedź cytotoksyczną limfocytów T. Udowodniono również, że komórki białaczki wytwarzają substancje hamujące dojrzewanie tymocytów w grasicy. Inną istotną przyczyną może być szybki przyrost łącznej masy komórek nowotworowych, podczas gdy liczba prekursorowych swoistych komórek T zbyt wolno wzrasta, by możliwe było skuteczne usunięcie guza. Wszystko to przyczynia się do wystąpienia zjawiska tolerancji, gdy układ immunologiczny nie odpowiada bądź odpowiedź na pojawiające się komórki nowotworowe jest niewystarczająca.

Ignorancja, anergia – przyczyny tolerancji

Jedną z przyczyn tolerancji jest zjawisko **ignorancji**, co dobrze ilustruje następująca obserwacja (ryc. 13.7). Badano zachowanie się różnych przeszczepów do myszy transgenicznej, u której prawie wszystkie limfocyty T $CD8^+$ były swoiście skierowane przeciw jednej grupie własnych peptydów naturalnych, będących fragmentami enzymu dehydrogenazy α-ketoglutaranu (DKG) występującego w komórkach skóry i komórkach nowotworowych. Peptydy DKG były prezentowane w związku z MHC klasy I.

U myszy tej przeszczepy skóry DKG^+ były odrzucane, ale nowotwory DKG^+ dobrze rosły. Jednocześnie transgeniczne limfocyty T $CD8^+$ mogły rozpoznawać ten sam epitop zarówno na komórkach guza, jak i na komórkach prawidłowych. W czasie wzrostu guz nie tracił ekspresji DKG. Komórki guza nie miały też ekspresji Fas-Ligand (Fas-L) na powierzchni, co powodowałoby zabijanie limfocytów atakujących nowotwór (zob. niżej). Traktowanie myszy przeciwciałem anty-CD8, ale nie anty-CD4, zapobiegało odrzuceniu przeszczepu skóry, co potwierdza konieczny udział w tym procesie limfocytów T CD8. Komórki nowotworowe w teście *in vitro* były lizowane przez swoiste komórki T, ale *in vivo* proces ten nie zachodził. Zaobserwowano więc, że w przypadku rosnącego nowotworu brak aktywacji swoistych przeciwnowotworowych limfocytów T w miejscu guza może być przeszkodą w leczeniu bądź zapobieganiu wzrostowi nowotworu noszącego rozpoznawalne antygeny. Bez dodatkowego bodźca układ działa tak, jakby ignorował obecność



Rycina 13.7 Tolerancja immunologiczna nowotworu nie zależy od „wyczerpania się" swoistych limfocytów T $CD8^+$ cytotoksycznych, które są obecne i atakują przeszczep skóry, ale nie atakują przeszczepu nowotworu rosnącego jednocześnie u tego samego zwierzęcia. Jest to tzw. zjawisko ignorancji, gdy obecne cytotoksyczne limfocyty skierowane przeciw epitopowi w komórkach nowotworowych, ignorują obecność tych komórek. Użyto transgenicznych myszy z limfocytami T $CD8^+$ cytotoksycznymi skierowanymi przeciw epitopowi dehydrogenazy α-ketoglutaranu (DHG), enzymowi obecnemu w komórkach przeszczepianej skóry i nowotworu: **a**. przeszczep skóry był odrzucany po 12–13 dniach, gdyż limfocyty T cytotoksyczne rozpoznawały epitop DHG w związku z MHC klasy I; **b.** przeszczep nowotworu rósł, nie był odrzucany, mimo że jego komórki miały epitop DHG i ekspresję MHC klasy I; **c**. w przypadku jednoczesnego przeszczepu skóry oraz nowotworu tylko skóra była odrzucana, a nowotwór rósł. Można wnioskować, że limfocyty T cytotoksyczne są obecne i aktywne, ale ignorują obecność komórek nowotworowych.

antygenu prezentowanego w związku z MHC klasy I na komórkach nowotworowych.

Anergię przypisuje się głównie brakowi sygnałów kostymulujących zależnych od oddziaływania CD28 i CD80. Aktywację limfocytów T mających receptor CD28 zwiększa ligand CD80 (B7-1) na komórkach docelowych, w tym przypadku nowotworowych. Komórki nowotworowe mogą nie mieć cząsteczek kostymulujących (B7), oddziałujących z CD28 limfocytów T cytotoksycznych i wzmacniających ich cytotoksyczny efekt. Nowotwory immunogenne, np. mysi chłoniak RMA, EL4, mastocytoma P815, nie mają ekspresji ligandu B7 i są tumorogenne po wszczepieniu do myszy syngenicznej, ale tracą tumorogenność po transfekcji B7. Prawdopodobnie wtedy jest możliwa skuteczna kostymulacja cytotoksycznych limfocytów T niszczących komórki nowotworowe. Nowotwory nieimmunogenne, jak mysi mięsak MCA101 czy melanoma B16, po transfekcji genem B7 pozostają tumorogenne. Kostymulacja jest więc konieczna na etapie oddziaływania limfocyt T–komórka docelowa, ale warunkiem jej skuteczności jest immunogenność nowotworu.

Delecja swoistych limfocytów T może być spowodowana ekspresją Fas-L na komórkach nowotworowych. Jak zaobserwowano, swoiste, aktywowane cytotoksyczne limfocyty T (CTL), które mają ekspresję Fas, zbliżając się do komórek melanoma z FasL na powierzchni, otrzymują sygnał do apoptozy i są eliminowane. Obserwowano też inny mechanizm eliminacji swoistych CTL. Polega on na pobieraniu przez limfocyty T kompleksów peptyd–MHC od komórek prezentujących antygen w wyniku endocytozy zależnej od receptorów. W tym procesie limfocyty T prezentują pobrane antygeny nowotworowe w związku z MHC klasy I i stają się komórkami wrażliwymi na swoistą lizę przez sąsiednie limfocyty T (ang. *fraticide*). Zjawiska te dobrze tłumaczą wyczerpanie odpowiedzi limfocytów T wywołane znacznym ładunkiem antygenów dostarczanych przez nowotwór dużych rozmiarów.

Leczenie nowotworów

KLINIKA

Leczenie nowotworów – zabieg chirurgiczny i napromienianie – jest na ogół skuteczne tylko wtedy, gdy guz został wcześnie rozpoznany. **Chirurgiczne** usunięcie guza nowotworowego jest bardzo dawnym sposobem leczenia, ale często zabieg taki nie usuwa wszystkich komórek nowotworowych, które podczas zabiegu mogą zostać przesunięte poza teren guza. Te pozostawione komórki nowotworu dają początek nawrotowi guza. **Napromienianie** guza nowotworowego wymaga drogiej i precyzyjnej aparatury oraz dużego doświadczenia lekarza, aby nie uczynić szkody choremu, a zniszczyć guz. Również leczenie napromienianiem najczęściej nie usuwa wszystkich komórek nowotworu. Leczenie nowotworów układu hemopoetycznego jest trudne, gdyż dotyczy komórek stale przemieszczających się w organizmie. W takich przypadkach, jak również w pewnych guzach nowotworowych, stosuje się **chemioterapię**, która polega na podawaniu dożylnym bądź doustnym przez kolejne dni substancji hamujących podziały komórek bądź powodujących różnicowanie się i specjalizację komórek – co również może zatrzymać ich wzrost. Takie serie, nazywane też kursami leczenia, są powtarzane wielokrotnie. Niepożądanym skutkiem leczenia chemioterapeutykami jest zmniejszenie odporności chorego na powszechne zakażenia bakteryjne i wirusowe. Trwałe wyleczenia po chemioterapii obserwuje się w białaczkach dzieci oraz w raku jądra u mężczyzn. Chemioterapia jest również skuteczna w leczeniu chorych z kosmówczakiem oraz u około 15% chorych na raka drobnokomórkowego płuca. U dzieci po chemioterapii białaczek obserwowano jednak genetyczną niestabilność komórek nienowotworowych, liczne mutacje limfocytów T. Niepożądanymi dla chorego skutkami nie jest obciążone wykorzystanie w leczeniu nowotworów procesów naturalnej odporności, czyli **immunoterapia**. W wielu przypadkach immunoterapia może być również przewidziana jako leczenie paliatywne – podobnie jak chemioterapia, ale bez dodatkowo obciążającego chorego obniżenia ogólnej odporności.

Leczenie immunologiczne nowotworu zwykle nie jest samodzielnym postępowaniem, ale wspomagającym, skojarzonym z innymi sposobami leczenia, np. leczeniem chirurgicznym zmniejszającym masę guza. Późne rozpoznanie nowotworu i często duża jego masa w chwili rozpoznania są spowodowane wolno i niepostrzeżenie rozpoczynającą się chorobą, a czasem brakiem zdecydowania się chorego na leczenie. Taki stan jest niekorzystny. Celem leczenia immunologicznego jest zmniejszenie masy komórek nowotworowych oraz przełamanie tolerancji immunologicznej tak, aby limfocyty cytotoksyczne atakowały komórki nowotworowe.

W leczeniu chłoniaków B-komórkowych $CD20^+$ o małym stopniu złośliwości w klinice stosuje się chimeryczną immunoglobulinę skierowaną przeciw epitopowi CD20. Immunoglobulina ta ma mysie

części zmienne łańcuchów, ale ludzkie części stałe łańcuchów immunoglobulinowych, stąd nie jest szybko niszczona. Epitop CD20 jest zlokalizowany na limfocytach pre-B i dojrzałych B. Leczenie takim przeciwciałem wraz z chemiotrapią jest skuteczne. W leczeniu raka sutka stosuje się przeciwciało skierowane przeciw receptorowi EGF (receptor nabłonkowego czynnika wzrostu). Białko kodowane przez onkogen HER-2/new, stale aktywne bez udziału ligandu (zob. s. 298), przypomina receptor EGF i występuje często na komórkach raka sutka. Przeciwciało hamuje wzrost takiego nowotworu, szczególnie gdy leczenie immunoglobuliną łączy się z chemioterapią. Receptor EGF występuje na niektórych komórkach prawidłowych w niewielkiej ilości. Komórki nowotworowe związane ze skierowanymi przeciw nim immunoglobulinami są niszczone w reakcji cytotoksyczności zależnej od przeciwciał (ADCC; zob. rozdz. 12).

W powierzchniowym raku pęcherza moczowego stosuje się podawanie dopęcherzowe BCG (atenuowane prątki gruźlicy) celem wywołania miejscowego procesu zapalnego. Aktywuje to miejscowe limfocyty cytotoksyczne. Takie postępowanie jest ogólnie przyjęte, bo daje długotrwałe okresy zatrzymania bądź cofania się nowotworu. Pozwala to uniknąć bądź znacznie opóźnić chirurgiczne usunięcie pęcherza moczowego.

Inne metody immunologiczne to hamowanie w guzie nowotworowym wzrostu naczyń krwionośnych (angiogenezy) i przerywanie tolerancji immunologicznej nowotworu przez podanie choremu napromieniowanych komórek własnego nowotworu. Miejscowe podanie do nowotworu inhibitora angiogenezy (IL-12, IFN-α, inhibitora metaloproteinaz) powoduje gorsze odżywianie nowotworu i zmniejszenie jego masy. Stwarza to szansę na lepszy wynik leczenia nowotworu innymi sposobami.

Komórki usuniętego chirurgicznie nowotworu można wykorzystać do przerwania tolerancji immunologicznej. Komórki nowotworowe są *in vitro* napromieniane dawką blokującą ich podziały, ale niezabijającą. Komórki te są podawane choremu podskórnie w celu wywołania miejscowego odczynu zapalnego. Podane komórki nowotworowe podlegają apoptozie i aktywują komórki dendrytyczne. Aktywowane komórki dendrytyczne przenoszą się do węzłów chłonnych, gdzie po osiedleniu się aktywują przepływające tam dziewicze limfocyty T cytotoksyczne skierowane przeciw komórkom nowotworowym.

Piśmiennictwo

Balińska M., Brzezińska A., Wińska P.: *Nowotwory a starzenie*. Post. Biol. Kom. 2000, supl. 15, 27, 45.

Bartnik E., Lorenc A.: *Nowotwory a geny*. Post. Biol. Kom. 2000, supl. 15, 27, 5.

Grzelakowska-Sztabert B.: *Apoptoza i nowotwory*. Post. Biol. Kom. 2000, supl. 15, 27, 9.

Hus I., Kawiak J., Tabarkiewicz J., Radej S., Hoser G., Bojarska-Junak A., Schmitt M., Giannopoulos K., Dmoszyńska A., Roliński J.: *Immunotherapy with irradiated autologous leukemic cells in patients with B-CLL in early stages*. Oncol Rep. 2008, 20 (2): 443–451.

Janiak M.K., Wrembel-Wargocka J., Cheda A.: *Apoptoza popromienna – mechanizmy, rola biologiczna i możliwości wykorzystania w terapii nowotworów*. Post. Biol. Kom. 1999, 27, 285.

Jasińska A., Krzyżosiak W.J.: *BRCA1 i BRCA2 – geny dziedzicznych form raka piersi*. Post. Biol. Kom. 1998, supl. 10, 25, 93.

Kawiak J., Hoser G.: *Niektóre mechanizmy immunologiczne w nowotworach. Immunoterapia nowotworów w modelach zwierzęcych oraz w klinice*. Post. Biol. Kom. 2000, supl. 15, 27, 91.

Kobierzycki Ch., Malińska A., Dzięgiel P.: *Zastosowanie techniki mikromacierzy tkankowych (TMA) w badaniach nad markerami nowotworowymi w raku gruczołu piersiowego*. Post. Biol. Kom. 2012; 39 (3), 519.

Nowak J., Lewandowski K., Januszkiewicz D.: *RPLA telomerazy w rozwoju procesu nowotworowego*. Post. Biol. Kom. 2000, supl. 14, 27, 143.

Pławski A., Słomski R.: *Geny supresorowe nowotworów*. Post. Biol. Kom. 1998, supl. 10, 25, 251.

Pokrywka M., Lityńska A.: *Celując w czerniaka*. Post. Biol. Kom. 2012; 39 (1), 3.

Siedlecki J.A.: *Zastosowanie diagnostyki genetycznej w chorobach nowotworowych*. Post. Biol. Kom. 2000, supl. 15, 27, 79.

Statkiewicz M., Małecki M.: *Rola szlaku sygnałowego sonic hedgehog w nowotworzeniu: macierzyste komórki nowotworowe, oporność wielolekowa*. Post. Biol. Kom. 2012; 39 (3), 531.

Szalata M., Słomski R.: *Zakończenia chromosomów: telomery, telomeraza i białka współdziałające*. Post. Biol. Kom. 2000, supl. 14, 27, 95.

Wołowiec D.: *$p21^{WAF1/CIP1}$. Rola w fizjologii komórki i w rozrostach nowotworowych*. Post. Biol. Kom. 1999, 26, 101.

ROZDZIAŁ 14

Śródbłonek

Piotr Dzięgiel, Michał Nowicki, Marzenna Podhorska-Okołów

HASŁA

Śródbłonek (endotelium)

Jest to pojedyncza warstwa płaskich komórek wyścielających światło naczyń krwionośnych oraz jam serca. Z uwagi na syntezę licznych substancji, komórki śródbłonka biorą udział w regulacji przepływu krwi przez naczynia krwionośne oraz napięcia ich ściany, regulacji procesów krzepnięcia krwi, transporcie substancji z krwi do otaczających tkanek, procesach angio- i limfangiogenezy. Komórki endotelium tworzą także barierę pomiędzy krwią a różnymi tkankami i narządami oraz uczestniczą w funkcjonowaniu układu odpornościowego.

Cząsteczki CD (ang. *cluster of differentiation*)

Antygeny zlokalizowane na powierzchni komórek umożliwiające ich różnicowanie. Mogą być zarówno receptorami, jak i ligandami i dzięki temu uczestniczyć w procesach komórkowych (np. przekazywanie sygnałów, adhezja). Dzięki antygenom CD można rozpoznać i sklasyfikować różne typy komórek pełniących w organizmie wielorakie funkcje (np. komórki układu immunologicznego – limfocyty).

Tlenek azotu (NO)

NO jest nietrwałym, aktywnym związkiem, produkowanym w organizmie w komórkach endotelium przez śródbłonkową syntazę tlenku azotu (eNOS). Powoduje m.in. relaksację komórek mięśni gładkich ściany naczyń krwionośnych oraz ich rozszerzenie i zwiększenie przepływu przez nie krwi. Tlenek azotu posiada również właściwości hamujące agregację płytek krwi.

VEGF (ang. *vascular endothelial growth factor*)

Naczyniowo śródbłonkowy czynnik wzrostu stanowi grupę białek (VEGF-A, -B, -C, -D) odgrywających podstawową rolę w procesach waskulogenezy, angio- i limfangiogenezy. Wpływa głównie na komórki śródbłonka, stymulując je do proliferacji i migracji, co w konsekwencji prowadzi do tworzenia nowych naczyń krwionośnych oraz limfatycznych.

Angiogeneza

Proces tworzenia nowych naczyń krwionośnych z już istniejących, zachodzący zarówno w okresie rozwoju embrionalnego, jak i w organizmach dojrzałych. Zjawisko to rzadko jest obserwowane w stanach fizjologicznych (regeneracja endometrium w cyklu miesiączkowym), natomiast często występuje w stanach patologicznych (gojenie ran, niedokrwienie, zapalenie, nowotwory). W angiogenezie kluczową rolę odgrywają VEGF, czynnik wzrostu fibroblastów (bFGF, *basic fibroblast growth factor*) oraz metaloproteinazy (MMP).

OGÓLNA CHARAKTERYSTYKA KOMÓREK ŚRÓDBŁONKA

Śródbłonek (endotelium) do niedawana był postrzegany jedynie jako warstwa oddzielająca krążącą krew od pozostałych elementów ściany naczynia, a dzięki temu od sąsiednich tkanek. Specyficzna budowa komórek śródbłonka umożliwia wymianę między krwią a otaczającymi tkankami wielu substancji oraz przechodzenie komórek układu immunologicznego, np. monocytów i leukocytów. Liczba komórek śródbłonka naczyniowego wynosi ok. 6×10^{13}, ich całkowita masa może sięgać 1–2 kg, a powierzchnia dochodzi do ok. 350 m^2. Obecnie śródbłonek jest uważany za aktywny i dynamiczny narząd, który bierze udział w wielu procesach fizjologicznych związanych z utrzymaniem prawidłowej homeostazy naczyniowej. Komórki śródbłonka są zdolne do wydzielania wielu aktywnych biologicznie substancji wywierających bezpośredni wpływ na napięcie ściany naczyń oraz procesy krzepnięcia, czego efektem jest utrzymanie prawidłowego przepływu krwi przez narządy oraz regulacja ciśnienia krwi. Wykazano także istotną rolę komórek śródbłonka w powstawaniu nowych naczyń krwionośnych zarówno *de novo* (waskulogeneza), jak również z już istniejących naczyń (angiogeneza). Ponadto komórki endotelium syntetyzują cząsteczki adhezyjne, a także uczestniczą w procesie proliferacji mięśni gładkich ściany naczyń.

Uszkodzenie komórek śródbłonka w wyniku działania na nie różnych czynników (np. hiperlipidemia, hiperglikemia, palenie tytoniu) prowadzi do zaburzenia ich funkcji. Dysfunkcja endotelium powoduje zmianę napięcia oraz przebudowę poszczególnych elementów ściany naczyń, zainicjowanie mechanizmów związanych z procesem zapalnym oraz zaburzenia krzepliwości krwi, a w konsekwencji powstanie wielu patologii w układzie naczyniowym (miażdżyca, nadciśnienie tętnicze, cukrzyca) prowadzących do zmian wielonarządowych.

Śródbłonek odgrywa również ważną rolę w progresji procesu nowotworowego. Wzrost guza spowodowany nasiloną proliferacją komórek nowotworowych jest możliwy dzięki powstawaniu nowych naczyń krwionośnych (angiogeneza), umożliwiających jego odżywianie. Z kolei powstawanie przerzutów jest związane z pokonaniem przez komórki nowotworowe bariery śródbłonkowej i przedostaniem się ich do światła naczyń limfatycznych i krwionośnych (intrawazacja), a następnie (po migracji z prądem krwi) na zewnątrz naczyń (ekstrawazacja) do narządów docelowych.

Budowa komórek śródbłonka

Śródbłonek składa się z pojedynczej warstwy płaskich i bardzo cienkich komórek nabłonkowych, tworzących wewnętrzną warstwę naczyń krwionośnych, limfatycznych oraz jam serca. Komórki śródbłonka są spłaszczone, posiadają centralnie położone, wydłużone jądro oraz cienką obwodową warstwę cytoplazmy o grubości zróżnicowanej w zależności od średnicy naczynia, od 0,1 μm w naczyniach włosowatych do 1 μm w aorcie. Komórki śródbłonka spoczywają na błonie podstawnej i są ze sobą ściśle związane za pomocą połączeń międzykomórkowych (strefy zamykające); tworząc w ten sposób anatomiczną barierę między krwią a otaczającymi tkankami. Bariera ta umożliwia jednak selektywny transport małych cząsteczek poprzez cienką warstwę cytoplazmy, czego efektem jest obecność w komórkach śródbłonka znacznej liczby pęcherzyków endocytarnych. W niektórych miejscach organizmu budowa komórek śródbłonka oraz błony podstawnej ulega modyfikacjom związanym głównie z funkcją narządu. Przykładem są liczne pory występujące w cytoplazmie komórek śródbłonka (śródbłonek okienkowy, np. w kłębuszkach nerkowych) lub zarówno w cytoplazmie jak i w błonie podstawnej (śródbłonek nieciągły, np. w wątrobie), umożliwiające transport dużych cząsteczek (np. hormonów czy białek), które nie mogą przejść przez błonę komórkową endotelium.

Pulę wszystkich komórek śródbłonka dorosłego człowieka stanowi kilka subpopulacji:
- dojrzałe komórki śródbłonka wyścielające istniejące naczynia – ECs (*endothelial cells*),
- progenitorowe (prekursorowe) komórki śródbłonka w szpiku kostnym – EPCs (*endothelial progenitor cells*),
- krążące komórki śródbłonka – CECs (*circulating endothelial cells*), pochodzące z komórek prekursorowych EPCs ze szpiku kostnego lub będące złuszczonymi komórkami śródbłonka naczyń krwionośnych.

Poszczególne populacje tych komórek rozpoznaje się na podstawie obecności lub braku swoistych markerów powierzchniowych. Do podstawowych markerów stopnia dojrzałości i funkcjonalności endotelium należą czynniki CD31, CD34, CD133 oraz czynnik von Willebranda.

Antygen CD31 (PECAM-1) jest białkiem przezbłonowym o masie cząsteczkowej 130 kD, pełniącym rolę w interakcjach adhezyjnych pomiędzy sąsiadującymi komórkami śródbłonka oraz pomiędzy leukocytami i śródbłonkiem. Białko to należy do nadrodziny immunoglobulin, zwanej PECAM (*platelet*

endothelial cell adhesion molecule – płytkowo-śródbłonkowa cząsteczka adhezji komórkowej). Antygen CD31 występuje w błonie komórkowej śródbłonka naczyń krwionośnych (tętnic, tętniczek, żył, żyłek i naczyń włosowatych z wyjątkiem naczyń włosowatych śledziony) oraz śródbłonku naczyń limfatycznych.

Antygen CD34 jest białkiem transbłonowym o masie cząsteczkowej 115 kD, uczestniczącym w adhezji komórek śródbłonka oraz ich migracji podczas dojrzewania nowych naczyń. Antygen CD34 występuje w błonie komórkowej wielu komórek hematopoetycznych szpiku kostnego. Ekspresję CD34 obserwuje się w początkowych stadiach rozwoju komórek prekursorowych EPCs oraz we wczesnych etapach tworzenia naczyń. Wraz z dojrzewaniem EPCs nasilenie ekspresji tego antygenu na powierzchni komórek śródbłonka maleje. Dlatego CD34 jest bardzo często używany jako znacznik śródbłonka nowo powstających naczyń przy określaniu ich gęstości, m in. w guzach nowotworowych.

Antygen CD133 jest transbłonową glikoproteiną o masie cząsteczkowej około 120 kDa. Antygen ten bierze prawdopodobnie udział w regulacji procesu wzrostu i różnicowania komórek macierzystych. Jego ekspresja występuje na niedojrzałych komórkach linii hematopoetycznej i gwałtownie maleje w miarę ich różnicowania się. Dlatego obecności antygenu CD133 nie obserwuje się na dojrzałych komórkach wywodzących się ze szpiku oraz na dojrzałych komórkach śródbłonka. W warunkach prawidłowych u ludzi liczba komórek CD133t wynosi 3–4 komórki/μl.

Czynnik von Willebranda (vWF) jest glikoproteiną zbudowaną z kilku podjednostek o masie cząsteczkowej w zakresie od 500 kDa do ponad 10 000 kDa. Występuje on w ciałkach Weibel-Palade'a i w aparacie Golgiego komórek śródbłonka oraz w ziarnistościach megakariocytów. Białko to pośredniczy w adhezji trombocytów do uszkodzonego śródbłonka oraz jest transporterem czynnika VIII w osoczu, chroniąc go przed działaniem enzymów proteolitycznych. Ekspresja tego antygenu występuje jedynie na dojrzałych komórkach śródbłonka i w megakariocytach. Stąd czynnik vWF jest uznawany za marker śródbłonka dojrzałych naczyń krwionośnych, pozbawionych możliwości regeneracyjnych.

Funkcje komórek śródbłonka

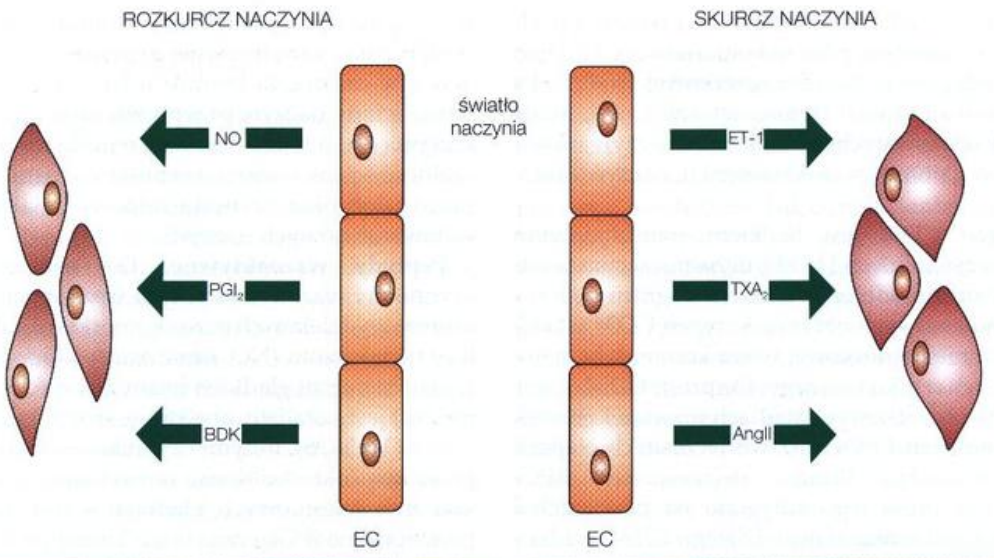
Jak wykazano, komórki śródbłonka oprócz funkcji związanej z tworzeniem bariery i transportem cząsteczek są zdolne do produkcji oraz wydzielania wielu substancji, stąd obecnie śródbłonek jest uważany za narząd wydzielniczy. Komórki śródbłonka syntetyzują wazoaktywne peptydy i biologicznie aktywne cząsteczki biorące udział w regulacji napięcia ściany naczyń, przepływu krwi oraz procesu krzepnięcia, a także czynniki regulujące przepuszczalność ściany naczyń, czynniki wzrostu, cytokiny prozapalne oraz czynniki odpowiedzialne za powstawanie nowych naczyń.

Peptydy wazoaktywne. Do najważniejszych czynników wazodylatacyjnych (rozszerzających naczynia) wydzielanych przez komórki śródbłonka należy tlenek azotu (NO, *nitric oxide*), który powoduje rozkurcz mięśni gładkich ściany naczyń. Powstawanie NO jest katalizowane przez śródbłonkową syntazę NO (eNOS). Innymi czynnikami wydzielanymi przez komórki śródbłonka powodującymi relaksację komórek mięśniowych gładkich ściany naczyń są prostacyklina (PGI_2) oraz bradykinina (BDK). Peptydy rozkurczające ścianę naczyń krwionośnych wykazują również silne działanie hamujące agregację i adhezję płytek krwi oraz proliferację komórek mięśniowych gładkich ściany naczyń. Z kolei do czynników wazokonstrykcyjnych (kurczących naczynia), syntetyzowanych w komórkach śródbłonka należą endotelina-1 (ET-1), tromboksan A_2 (TXA_2), prostaglandyna H_2 oraz angiotensyna II (Ang II). Efektem biologicznym ich działania jest skurcz naczyń krwionośnych, agregacja płytek, stymulacja wytwarzania cząsteczek adhezyjnych na powierzchni śródbłonka i leukocytów oraz pobudzenie proliferacji komórek mięśniówki gładkiej. Prawidłowy stan napięcia ściany naczyń krwionośnych oraz prawidłowa hemostaza naczyniowa są uwarunkowane równowagą wydzielania czynników rozszerzających i antyagregacyjnych oraz kurczących naczynia i proagregacyjnych, a ich przesunięcie może prowadzić do rozwoju różnych chorób (ryc. 14.1).

Czynniki krzepnięcia to głównie czynnik von Willebranda i trombomodulina. Czynnik von Willebranda bierze udział w aktywacji procesu krzepnięcia krwi, natomiast trombomodulina ma działanie przeciwne i uczestniczy w jego hamowaniu.

Czynnik wzrostu naczyniowo-śródbłonkowy (VEGF, *vascular endothelial growth factor*) jest podstawowym regulatorem procesu różnicowania komórek śródbłonka, powstawania nowych naczyń krwionośnych (waskulogeneza) oraz tworzenia odgałęzień z już istniejącej sieci naczyń (angiogeneza); jest jednym z najważniejszych czynników wzrostu i przeżycia śródbłonka naczyń.

Cytokiny, głównie interleukina 1 (IL-1), odgrywająca istotną rolę w regulacji odpowiedzi immunologicznej i zapalnej.



Rycina 14.1 Rola śródbłonka w regulacji napięcia ściany naczyń krwionośnych. EC – komórki śródbłonka; NO – tlenek azotu; PGI_2 – prostacyklina; BDK – bradykinina; ET-1 – endotelina-1; TXA_2 – tromboksan A_2; Ang II – angiotensyna II.

Cząsteczki adhezyjne (CAM, ***cell adhesion molecules*****)** są odpowiedzialne za tworzenie połączeń między komórkami lub między komórkami a cząsteczkami macierzy zewnątrzkomórkowej. Komórki śródbłonka mają zdolność do syntezy selektyn (E- i P-selektyny), integryn (integryny $\alpha 1\beta 1$) oraz immunoglobulinopodobnych ICAM (głównie ICAM-1, ICAM-2, PECAM-1 i charakterystycznych dla komórek śródbłonka VCAM). Wzrost ekspresji CAM na komórkach śródbłonka w odpowiedzi na jego uraz mechaniczny lub wzrost stężenia cytokin prozapalnych w osoczu, umożliwia przechodzenie leukocytów przez barierę śródbłonkową z krwi do ognisk zapalnych (tzw. migracja leukocytów).

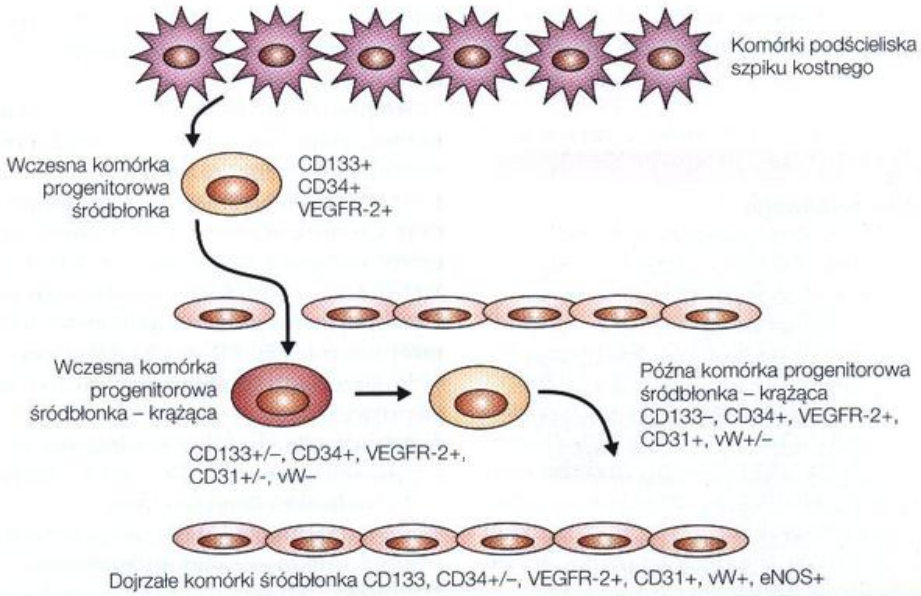
REGENERACJA ŚRÓDBŁONKA

Komórki śródbłonka żyją krótko, około 100 dni. Dodatkowo ich uszkodzeniu sprzyjają stany chorobowe powodujące dysfunkcję śródbłonka, takie jak hipercholesterolemia czy cukrzyca. Odnowa zużytego lub uszkodzonego śródbłonka może odbywać się poprzez podział istniejących komórek śródbłonkowych (ECs) lub w wyniku rekrutacji ze szpiku kostnego prekursorowych komórek EPCs.

Główną rolę w regeneracji śródbłonka naczyniowego odgrywają komórki EPCs, mające zdolność migracji ze szpiku kostnego do krwi obwodowej i różnicowania się w dojrzałe komórki śródbłonka (ryc. 14.2). Mobilizacji komórek EPCs ze szpiku do miejsc uszkodzenia lub wzmożonej angiogenezy (np. podczas wzrostu guza nowotworowego) sprzyja miejscowe nasilenie ekspresji czynników proangiogennych, takich jak VEGF, czynnik SDF-1 (*stroma derived factor-1*), czynnik HIF-1α (*hypoxia inducible factor-1*α), angiopoetyna czy erytropoetyna.

DYSFUNKCJA KOMÓREK ŚRÓDBŁONKA A CHOROBY UKŁADU KRĄŻENIA

Dysfunkcja komórek śródbłonka może być zarówno pierwotną, jak i wtórną przyczyną chorób układu krążenia. Najbardziej powszechne oraz znane zaburzenia funkcji komórek śródbłonka naczyń tętniczych prowadzą do wielu zmian patologicznych, których efektem jest rozwój miażdżycy. Choroba ta pojawia się najczęściej w wyniku nasilonej i przewlekłej hiperlipidemii powodującej zaburzenie funkcji komórek endotelium. Krążące we krwi w nadmiernej ilości lipidy, głównie cholesterol związany z LDL (*low-density lipoprotein*) oraz trójglicerydy, są początkowo odkładane pod warstwą komórek śródbłonka, a następnie w samych komórkach endotelium (śródbłonkowe komórki piankowate), powodując ich dysfunkcję. W uszkodzonych komórkach śródbłonka spada aktywność eNOS, czego efektem jest zmniejszenie produkcji tlenku azotu (NO). Ponadto, w komór-



Rycina 14.2 Schematyczny proces rekrutacji, dojrzewania i wbudowywania w śródbłonek pochodzących z podścieliska szpiku kostnego komórek progenitorowych śródbłonka w aspekcie ekspresji ich markerów powierzchniowych. VEGFR-2 – receptor 2 dla naczyniowo śródbłonkowego czynnika wzrostu; VW – czynnik von Willebranda; eNOS – śródbłonkowa forma syntazy tlenku azotu.

kach tych dochodzi do zwiększonej produkcji cytokin prozapalnych oraz cząsteczek adhezyjnych, co w konsekwencji inicjuje napływ komórek układu immunologicznego (głównie limfocytów i makrofagów) produkujących nadmierną ilość reaktywnych form tlenu (RFT). Jest to główną przyczyną rozwoju stanu zapalnego w ścianie naczynia. Przewlekła hiperlipidemia prowadzi również do odkładania się lipidów w komórkach mięśniowych gładkich ściany naczyń tętniczych, co jednocześnie stymuluje ich proliferację. W ten sposób rozwija się blaszka miażdżycowa, zmniejszająca światło naczynia oraz upośledzająca przepływ krwi. Wszystkie te zmiany, zarówno morfologiczne, jak i funkcjonalne obniżają zdolność rozkurczową ściany naczynia, prowadząc do wzrostu ciśnienia tętniczego krwi.

Hipoteza rozwoju miażdżycy traktuje zatem tę chorobę jako przewlekłą odpowiedź ścian naczyń tętniczych o charakterze zapalnym, zapoczątkowaną uszkodzeniem śródbłonka. Istotne są w niej następujące procesy:

- przewlekłe uszkodzenie śródbłonka prowadzące do odsłaniania jego błony podstawnej oraz podśródbłonkowej tkanki łącznej, co doprowadza do zwiększonej przepuszczalności i przylegania leukocytów,
- akumulacja w uszkodzonym obszarze śródbłonka lipoprotein (przede wszystkim frakcji o małej gęstości – LDL) połączona z ich utlenianiem,
- przyleganie monocytów do śródbłonka, po którym następuje ich migracja do błony wewnętrznej i transformacja w makrofagi i komórki piankowate,
- agregacja i aktywacja płytek krwi w miejscu uszkodzenia,
- uwalnianie przez aktywowane płytki, makrofagi lub komórki naczyń czynników powodujących migrację komórek mięśni gładkich z błony środkowej do błony wewnętrznej,
- proliferacja i gromadzenie lipidów w komórkach mięśniowych gładkich błony wewnętrznej i produkcja macierzy pozakomórkowej zawierającej włókna kolagenowe, sprężyste w tętnicach oraz proteoglikany.

Podobny mechanizm sekwencji zmian miażdżycowych może zachodzić w cukrzycy podczas rozwoju powikłań naczyniowych spowodowanych przewlekłą hiperglikemią. U osób starszych metabolizm węglowodanów podlega zaburzeniom, częsta jest cukrzyca typu II, czasem nierozpoznawana. Prowadzi to do zaburzeń funkcjonowania komórek mięśniowych gładkich w tętnicach i zawałów serca.

Jednym z głównych mechanizmów zapoczątkowujących dysfunkcję komórek śródbłonka jest uogólniony proces starzenia się organizmu. Wraz z wiekiem obserwuje się istotne zmniejszenie liczby krążących komórek progenitorowych śródbłonka (EPCs), co znacznie ogranicza ich potencjał re-

generacyjny. Przyczynia się to do rozwoju wielu schorzeń układu krążenia, takich jak miażdżyca, nadciśnienie tętnicze czy niewydolność mięśnia sercowego.

KLINIKA

Zawał mięśnia sercowego

Komórki mięśnia sercowego (kardiomiocyty) są zaopatrywane w tlen i substancje odżywcze przez bogatą sieć naczyń wieńcowych. Dysfunkcja tętnic wieńcowych, której konsekwencją jest wstrzymanie przepływu krwi przez pojedyncze naczynie lub jego rozgałęzienie, uniemożliwia odżywienie kardiomiocytów danego obszaru mięśnia sercowego. Prowadzi to w konsekwencji do martwicy komórek mięśnia sercowego, co potocznie jest określane mianem zawału serca. W patogenezie tego zjawiska odgrywają rolę zmiany miażdżycowe w obrębie tętnic wieńcowych, skurcz mięśni gładkich ściany ww. naczyń oraz lokalnie zachodzący proces krzepnięcia krwi w zmienionym odcinku naczynia wieńcowego. Wszystkie wymienione zaburzenia w obrębie tętnicy wieńcowej są związane z upośledzoną funkcją komórek endotelium. Wykazano, że produkowany w śródbłonku NO zapobiega rozwojowi naczyniowych zmian miażdżycowych. Z kolei swobodny, laminarny przepływ krwi warunkuje aktywność eNOS, odpowiedzialnej za produkcję NO, który wykazuje silne działanie powodujące rozkurcz mięśni gładkich naczyń (w tym tętnic wieńcowych). Ponadto NO działa przeciwkrzepliwie i profibrynolitycznie, zapobiegając zaburzeniom przepływu krwi przez naczynia wieńcowe. Podobny mechanizm zmian oraz roli śródbłonka w ich powstawaniu dotyczy również innych naczyń tętniczych układu krążenia.

ROLA ŚRÓDBŁONKA W PROCESIE ANGIOGENEZY

Ważną cechą komórek śródbłonka jest ich zdolność do migracji i proliferacji pod wpływem różnych bodźców, co umożliwia powstanie nowych naczyń krwionośnych z już istniejącego łożyska naczyniowego (angiogeneza). Proces ten może zachodzić zarówno w stanach fizjologicznych, jak i patologicznych. Fizjologiczną angiogenezę obserwuje się między innymi w regeneracji błony śluzowej macicy (endometrium) w cyklu miesięcznym oraz podczas implantacji zarodka. Z kolei proces angiogenezy patologicznej zachodzi w warunkach niedoboru tlenu (hipoksja) i w przewlekłych stanach zapalnych, obserwowanych m.in. podczas wzrostu złośliwych guzów nowotworowych.

Angiogeneza jest procesem wieloetapowym, rozpoczynającym się od pobudzenia komórek śródbłonka przez różnorodne czynniki wzrostu, z których najważniejszą rolę odgrywają VEGF oraz czynnik wzrostu fibroblastów bFGF. Do rodziny czynnika VEGF należą: VEGF–A, VEGF–B, VEGF–C oraz VEGF–D, które łączą się ze swoistymi, występującymi głównie na komórkach śródbłonka receptorami: VEGFR–1, VEGFR–2 oraz VEGFR–3.

W przebiegu angiogenezy można wyróżnić następujące etapy:

- pobudzenie komórek śródbłonka przez czynniki proangiogenne (VEGF, bFGF) doprowadzające do rozluźnienia endotelium,
- degradacja błony podstawnej i macierzy pozakomórkowej przez enzymy proteolityczne,
- adhezja i migracja komórek śródbłonka poprzez wzrost ekspresji integryn $\alpha\beta$,
- proliferacja komórek śródbłonka oraz wytworzenie tubularnych struktur nowego naczynia krwionośnego,
- dojrzewanie śródbłonka i otoczenie nowo powstałych naczyń przez komórki mezenchymalne.

Proces angiogenezy rozpoczyna się w momencie lokalnego zwiększenia stężenia czynników wzrostu VEGF oraz bFGF w otoczeniu komórek śródbłonka, co doprowadza do rozluźnienia połączeń międzykomórkowych i wzrostu przepuszczalności naczyń krwionośnych. Jednocześnie dochodzi do aktywacji enzymów proteolitycznych z rodziny metaloproteinaz (MMP, *matrix metalloproteinases*) powodujących rozkład błony podstawnej oraz macierzy pozakomórkowej, co toruje drogę dla migrujących i proliferujących komórek śródbłonka. Komórki te, łącząc się tworzą nowe, niedojrzałe struktury tubularne prymitywnych naczyń. W dojrzewaniu nowo powstałych naczyń ważną rolę odgrywa płytkopochodny czynnik wzrostu (PDGF, *plateled derived growth factor*), wydzielany głównie przez płytki krwi i komórki śródbłonka. Pod wpływem PDGF następuje przyciąganie z macierzy zewnątrzkomórkowej komórek mezenchymalnych, które w wyniku interakcji z komórkami śródbłonka wytwarzają błonę podstawną oraz przekształcają się w otaczające naczynie pericyty. Do ostatecznego ukształtowania się naczynia poza PDGF jest niezbędna również obecność angiopoetyn i ich receptorów o właściwościach kinazy tyrozynowej (Tie1, Tie2), które umożliwiają połączenie komórek śródbłon-

ka z komórkami mezenchymalnymi i stworzenie między nimi stabilnych interakcji mechanicznych oraz biochemicznych.

Populacja progenitorowych komórek śródbłonka składa się z trzech rodzajów komórek. Należą do nich wczesne komórki progenitorowe śródbłonka rekrutowane z macierzystych komórek podścieliska szpiku kostnego (EPCs) oraz wczesne i późne komórki progenitorowe śródbłonka – krążące w łożysku naczyniowym. Rekrutacja wczesnych komórek progenitorowych śródbłonka z komórek macierzystych podścieliska szpiku kostnego zachodzi przede wszystkim pod wpływem różnych form VEGF. Wspólnym receptorem dla wszystkich opisanych form VEGF jest VEGFR-2. Na powierzchni wczesnej EPCs stwierdza się obecność VEGFR-2 oraz klasycznych markerów komórek macierzystych – CD34 i CD133. Ekspresja VEGFR-2 na powierzchni EPCs utrzymuje się aż do osiągnięcia formy maksymalnie zróżnicowanej, tj. dojrzałej komórki śródbłonka. Podsumowując, można stwierdzić, że kluczową rolę w procesie angiogenezy odgrywają czynniki z rodziny VEGF. Regulują one nie tylko różnicowanie EPCs, lecz także poprzez rozluźnienie połączeń zwiększają przepuszczalność śródbłonka naczyniowego, co ułatwia migrację EPCs do światła łożyska naczyniowego i formowanie nowych naczyń.

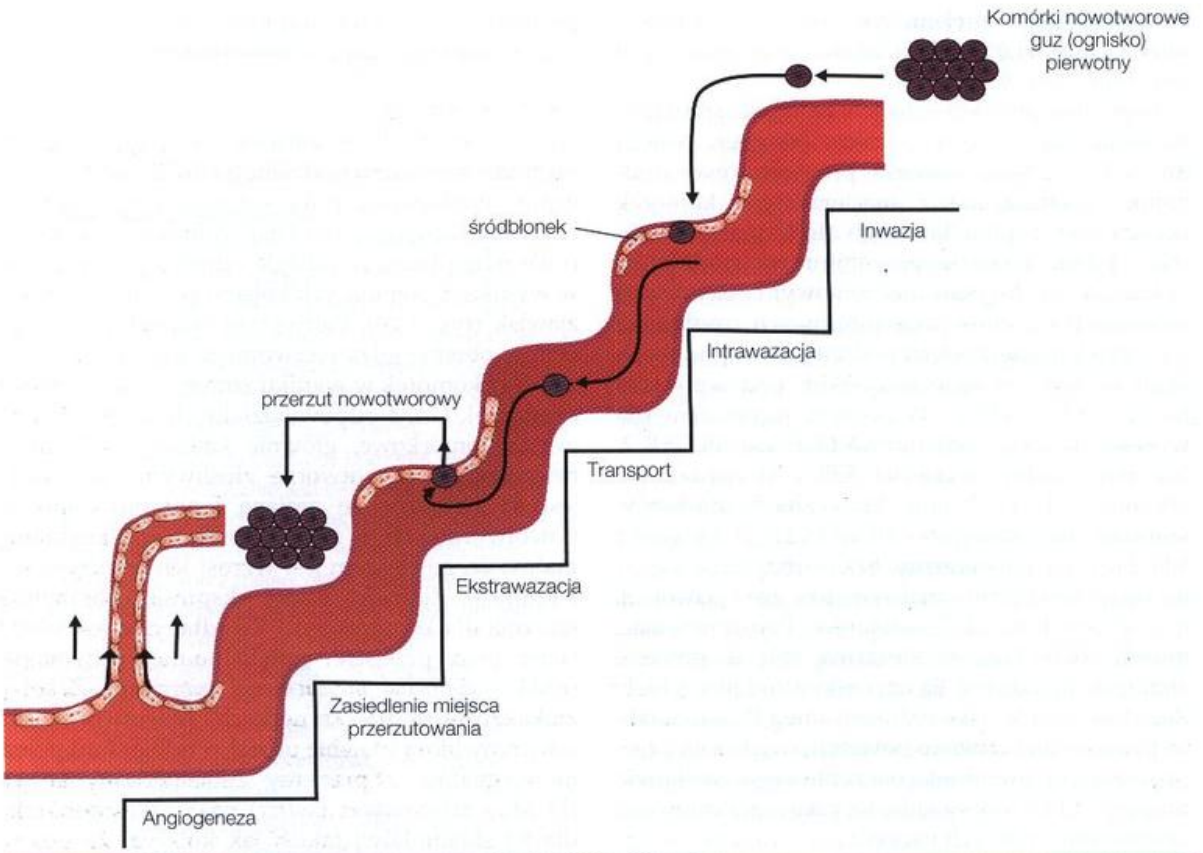
ROLA ŚRÓDBŁONKA W CHOROBACH NOWOTWOROWYCH

Najważniejszą cechą nowotworów złośliwych jest zdolność do przemieszczania się ich komórek (migracja), przekraczania naturalnych barier morfologicznych, jak np. błony podstawnej (inwazja), a w konsekwencji przedostawanie się do światła naczyń krwionośnych oraz limfatycznych. Dzięki tym procesom, komórki nowotworowe mogą znajdować się przez pewien czas w krwiobiegu (krążące komórki nowotworowe – CTCs, *circulating tumour cells*), a następnie przedostawać się do tkanek i narządów odległych od guza pierwotnego. Ponadto, komórki nowotworowe poprzez syntezę i wydzielanie m.in. czynników proangiogennych oraz metaloproteinaz wpływają na procesy angio- i limfangiogenezy, umożliwiające ich rozprzestrzenianie się w organizmie. W zjawisku migracji, inwazji oraz przerzutowania komórek nowotworowych istotną rolę odgrywają komórki śródbłonka istniejących naczyń krwionośnych i limfatycznych, jak również tych, które dopiero powstają w wyniku angio- i limfangiogenezy nowotworowej.

Mechanizm tworzenia przerzutów

Nowotwory złośliwe człowieka ze względu na ich pochodzenie można podzielić na dwie podstawowe grupy: nabłonkowe (raki, *carcinoma*) oraz mezenchymalne (mięsaki, *sarcoma*). Komórki nowotworowe mogą tworzyć odlegle ogniska przerzutowe w wyniku następujących kolejno po sobie w czasie zjawisk (ryc. 14.3). Pierwszym etapem zachodzącym w obrębie guza pierwotnego jest utrata adhezyjności komórek w wyniku zmniejszenia ekspresji cząsteczek CAM odpowiedzialnych za połączenia międzykomórkowe, głównie kadheryn. W raku, najczęstszym nowotworze złośliwym człowieka, jest to związane ze zmianą fenotypu komórek nowotworowych z nabłonkowego w mezenchymalny, czego efektem jest wzrost ich inwazyjności i migracji. Zjawisko utraty ekspresji, charakterystycznej dla komórek raka E-kadheryny, jest określane jako przejście epitelialno-mezenchymalne (EMT – *epithelial mesenchymal transition*). Z kolei zlokalizowane na komórkach nowotworowych integryny biorą głównie udział w odbieraniu przez nie sygnałów z macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM – *extracellular matrix*) oraz są receptorami dla jej składników, takich jak kolagen, laminina, fibronektyna, witronektyna. Ligandami integryn są także immunoglobulinopodobne CAM (ICAM1, VCAM-1), występujące m. in. na powierzchni komórek śródbłonka.

Kolejne etapy tworzenia przerzutów nowotworowych, obejmujące procesy inwazji, intrawazacji oraz ekstrawazacji (przenikanie komórek nowotworowych do wnętrza oraz na zewnątrz naczyń), zachodzą w wyniku utraty adhezyjności komórek nowotworowych, jak również dzięki działaniu syntetyzowanych przez nie enzymów proteolitycznych (głównie MMPs) oraz proteaz serynowych (głównie systemu aktywatora plazminogenu). W wyniku ich działania zachodzi degradacja składników błony podstawnej oraz ECM, a co się z tym wiąże migrujące komórki nowotworowe mogą wnikać do światła naczyń krwionośnych oraz limfatycznych (intrawazacja), a następnie je opuszczać (ekstrawazacja). Pomiędzy tymi dwoma zjawiskami komórki guza znajdują się w krwiobiegu i są nazywane krążącymi komórkami nowotworowymi (CTCs). To, gdzie osiedlą się CTCs, zależy od wielu czynników, m. in. od chemotaksji komórek nowotworowych do narządów docelowych, ale prawdopodobnie



Rycina 14.3 Rola śródbłonka w tworzeniu przerzutów nowotworowych.

głównie od specyficzności ich adhezji do komórek śródbłonka naczyń narządu docelowego. Zjawisko to zostało dobrze poznane i opisane w przypadku raka żołądka oraz czerniaka. Znajdujące się na powierzchni komórek nowotworowych w dużej ilości integryny łączą się ze specyficznymi cząsteczkami adhezyjnymi komórek śródbłonka m. in. ICAM1, VCAM1. Dla przykładu, prawdopodobnie integryny $\alpha 3\beta 1$ i $\alpha v\beta 3$ są odpowiedzialne za tworzenie ognisk przerzutowych raka żołądka oraz czerniaka w węzłach chłonnych, a z kolei integryny $\alpha 2\beta 1$ za przerzuty komórek raka żołądka do otrzewnej. Wzrost ekspresji ICAM1 oraz VCAM1 na powierzchni komórek śródbłonka jest związany z działaniem różnych cytokin, w tym prozapalnych. To zjawisko nasila przyleganie CTCs do endotelium w określonej lokalizacji. Podobne działanie mają inne cząstki adhezyjne nazywane selektynami (E-selektyna, P-selektyna oraz L-selektyna). Cząsteczki te uczestniczą w spowalnianiu przepływu leukocytów w naczyniach oraz przyleganiu ich do komórek endotelium, co w konsekwencji warunkuje proces toczenia się białych krwinek po komórkach śródbłonka. Podobne zjawisko dotyczy również krążących komórek nowotworowych, a odpowiedzialne za nie są przede wszystkim cząsteczki E-selektyn, zlokalizowane na powierzchni komórek endotelium. W guzach nowotworowych wzrost ekspresji selektyn jest obserwowany zarówno w śródbłonku naczyń, jak również w komórkach nowotworowych. W kolejnym etapie zostaje zainicjowany proces ekstrawazacji, przebiegający podobnie do intrawazacji. Należy pamiętać, że sam proces adhezji komórek nowotworowych do endotelium nie jest zjawiskiem wystarczającym do pokonania przez CTCs bariery śródbłonka oraz błony podstawnej. W wyniku wzajemnych interakcji ww. rodzajów komórek, zostają zaktywowane szlaki sygnalizacyjne, głównie kinaz tyrozynowych. W komórkach śródbłonka oraz nowotworowych zachodzą zmiany strukturalne m.in. cytoszkieletu, prowadzące do zmiany ich kształtu oraz wzrostu mobilności, co warunkuje proces ekstrawazacji, po którym na-

stępuje osiedlanie się komórek nowotworowych w odległym narządzie (przerzut nowotworowy).

Udział komórek śródbłonka w procesie angiogenezy nowotworowej

W 1971 roku Judah Folkman wykazał, że guzy nowotworowe mogą osiągnąć maksymalnie objętość 2 mm^3 bez naczyń krwionośnych zaopatrujących ich komórki. Odkrycie tworzenia sieci naczyń w obrębie guza (angiogeneza) było przełomowe w onkologii i zaowocowało ogromną liczbą badań, które doprowadziły do lepszego poznania biologii nowotworów oraz wdrożenia terapii antyangiogennych.

Naczynia krwionośne guza mogą formować się ze śródbłonka naczyń już istniejących i/lub krążących endotelialnych komórek progenitorowych (EPCs). W procesie angiogenezy nowotworowej czynniki stymulujące proliferację, różnicowanie oraz migrację śródbłonków są głównie syntetyzowane i wydzielane przez same komórki nowotworowe. Do nowotworowych czynników proangiogennych należą m. in.: VEGF, bFGF, HGF (*hepatocyte growth factor;* czynnik wzrostu hepatocytów), TGFβ (*transforming growth factor;* transformujący czynnik wzrostu), PD-ECGF (*platelet-derived endothelial cell growth factor;* płytkopochodny czynnik wzrostu komórek śródbłonka). Najważniejszą rolę odgrywają czynniki z rodziny VEGF, wiążące się z występującymi na komórkach śródbłonka odpowiednimi dla nich receptorami (VEGFR-1, -2, -3) należącymi do rodziny kinaz tyrozynowych. W ramach wiązania cząstek VEGF z ich receptorami istnieje pewna specyficzność, np.: VEGF-A łączy się z VEGFR-1 oraz VEGFR-2, VEGF-B z VEGFR-1, a z kolei VEGF-C i VEGF-D z receptorami VEGFR-2 oraz VEGFR-3. Receptor VEGFR-1 jest odpowiedzialny za stymulację migracji i różnicowania się komórek śródbłonka, a VEGFR-2 inicjuje proces ich proliferacji oraz wpływa na przepuszczalność ściany naczyń. Ekspresja VEGFR-1 oraz VEGFR-2 jest charakterystyczna dla śródbłonka naczyń krwionośnych, podczas gdy VEGFR-3 specyficznie występuje w naczyniach limfatycznych, co przemawia za jego udziałem w procesie limfangiogenezy.

Podsumowując można stwierdzić, że czynniki wzrostu śródbłonka oraz ich receptory są zaangażowane nie tylko w tworzenie sieci nowych naczyń krwionośnych i limfatycznych w obrębie guza nowotworowego, ale również w przepuszczalność endotelium, co w znacznym stopniu umożliwia komórkom nowotworowym pokonywanie bariery śródbłonkowej.

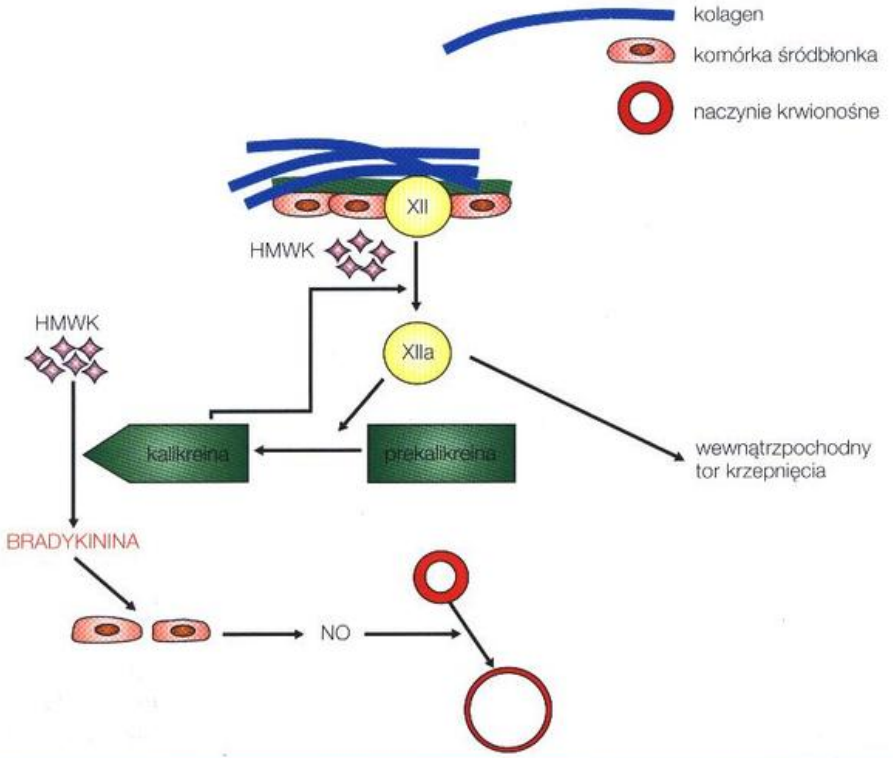
Rola komórek śródbłonka w procesie zapalnym

Uszkodzenie komórek śródbłonka w wyniku zadziałania różnorodnych czynników (endo- i egzogennych) prowadzi do aktywacji osoczowego czynnika Hagemana (czynnik XII) produkowanego przez hepatocyty. Przejście jego formy nieaktywnej (XII) w postać aktywną (XIIa) następuje w rezultacie kontaktu z białkami kolagenu lub aktywowanymi płytkami krwi (np. w uszkodzeniu śródbłonka) z udziałem wysokocząsteczkowego kininogenu (HMWK, *high molecular weight kininogen*), będącego kofaktorem czynnika XII. Czynnik XIIa o właściwościach proteolitycznych przekształca prekalikreinę w kalikreinę (proteaza serynowa), która z kolei efektywnie zmienia czynnik XII w formę aktywną XIIa, a ten ponownie prekalikreinę w kalikreinę (dodatnie sprzężenie zwrotne). W wyniku tego procesu gwałtownie rośnie poziom czynnika XIIa w miejscu uszkodzenia endotelium. Dochodzi do aktywacji **układu kininogenezy**, w którym ostatecznie poprzez działanie kalikreiny osoczowy HMWK zostaje przekształcony w bradykininę.

Bradykinina, działając podobnie jak histamina, powoduje wzrost przepuszczalności ściany naczyń na skutek obkurczenia się komórek śródbłonka i osłabia ich przyleganie, co sprawia, że osocze wraz z zawartymi w nim składnikami dyfunduje do przestrzeni pozanaczyniowej, wywołując obrzęk tkanek. Ponadto, w wyniku działania bradykininy, w komórkach śródbłonka jest aktywowana produkcja tlenku azotu (NO), który dyfundując do komórek mięśni gładkich naczyń powoduje ich rozkurcz (wzrost średnicy światła naczynia), a co za tym idzie – wzrost przepływu krwi (przekrwienie obszaru objętego procesem zapalnym) (ryc. 14.4). Dodatkowo bradykinina jest substancją silnie pobudzającą zakończenia nerwowe, czego efektem jest odczucie bólu w miejscu zapalnie zmienionym.

Aktywność bradykininy jest ograniczona w czasie ze względu na działanie dezaktywujących ją, występujących w osoczu oraz tkankach kininaz. Należy również pamiętać, że czynnik XIIa zapoczątkowuje także wewnątrzpochodny tor krzepnięcia krwi poprzez aktywacją kaskady białek biorących udział w tym procesie.

Jak widać z przytoczonych danych, układ kininogenezy odgrywa kluczową rolę w mechanizmie powstawania stanu zapalnego i jest ściśle funkcjonalnie powiązany z układem krzepnięcia, który szczególnie w przypadkach przerwania ciągłości ściany naczyń zapewnia przywrócenie homeostazy organizmu.



Rycina 14.4 Schemat układu kininogenezy w procesie zapalnym oraz rola komórek śródbłonka. Szczegółowy opis w tekście rozdziału.

Piśmiennictwo

Boczkowska-Gaik E., Tendera M.: *Patogeneza i leczenie ostrych zespołów wieńcowych*. Wiad. Lek. 2005; 58(7–8): 425–432.

Fritzenwanger M., Lorenz F., Jung C., Fabris M., Thude H., Barz D., Figulla H.R.: *Differential number of CD34⁺, CD133⁺ and CD34⁺/CD133⁺ cells in peripheral blood of patients with congestive heart failure*. Eur J Med Res. 2009; 14(3): 113–7.

Hinek A., Keeley F.W. Callahan J.: *Recycling of the 67-kDa elastin binding protein in arterial myocytes is imperative for secretion of tropoelastin*. Exp Cell Res. 1995 Oct; 220(2): 312–324.

Korta K., Kupczyk P., Skóra J., Pupka A., Zejler P., Hołysz M., Gajda M., Nowakowska B., Barć P., Dorobisz A.T., Dawiskiba T., Szyber P., Bar J.: *Komórki macierzyste i progenitorowe w biostrukturze ścian naczyń krwionośnych*. Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej 2013, 67: 982–995.

Lipski K.M., Ostrowski K., Komender J., Śladowski D.: *Udział śródbłonka w formowaniu naczyń*. Postępy Biologii Komórki 2006, 33(1): 59–70.

Mas M.: *A close look at the endothelium: its role in the regulation of vasomotor tone*. European Urology Supplements 2009; 8: 48–57.

Pecorino L.: *Molecular biology of cancer. Mechanisms, Targets and Therapeutics*. Oxford University Press 2012.

Poręba R., Derkacz A., Poręba M., Andrzejak R.: *Funkcja śródbłonka u osób z chorobami układu krążenia. Część I: Czynniki humoralne i badanie funkcji śródbłonka*. Arterial Hypertension 2005, 9(4): 294–300.

Shi J., Wang A., Sen S., Wang Y., Kim H.J., Mitts T.F., Hink A.: *Insulin induces production of new elastin in cultures of human aortic smooth muscle cells*. Am J Pathol. 2012 Feb; 180(2): 715–726.

Tomczyk M., Nowak W., Jaźwa A.: *Śródbłonek w fizjologii i patogenezie chorób*. Postępy Biochemii 2013, 59(4): 357–364.

Zabel M. (red.): *Histologia. Podręcznik dla studentów*. Elsevier Urban & Partner. Wrocław 2013.

ROZDZIAŁ 15

Metody badań budowy i funkcji komórek

Jan A. Litwin

HASŁA

Badanie *in situ* (w miejscu)

Badanie komórek lub ich składników w naturalnej lokalizacji i mikrośrodowisku, najczęściej na preparatach mikroskopowych.

Izolacja komórek

Technika prowadząca do uzyskania zawiesiny komórek, którą uzyskuje się w wyniku mechanicznego rozdrobnienia fragmentu tkanki lub narządu i potraktowania enzymami trawiącymi substancję międzykomórkową.

Hodowla komórek

Utrzymywanie przy życiu komórek poza ich naturalnym mikrośrodowiskiem (*in vitro*) przez umieszczenie ich w odpowiednich pożywkach, zawierających niezbędne do metabolizmu komórkowego substancje odżywcze, regulacyjne i jony.

Homogenizacja

Mechaniczne rozdrobnienie w płynie komórek lub tkanek, w wyniku czego uzyskuje się homogenat – zawiesinę składników komórkowych (jądra, mitochondria itp.) lub też ich fragmentów.

Elektroforeza

Metoda, w której wykorzystuje się zjawisko poruszania się cząstek obdarzonych ładunkiem w polu elektrycznym; szybkość poruszania zależy również od wielkości i kształtu cząsteczki. Metoda pozwala na rozdzielenie m.in. białek i kwasów nukleinowych.

Blotting (odciskanie)

Metoda identyfikacji rozdzielonych w procesie elektroforezy białek i kwasów nukleinowych. *Southern blotting* wykrywa DNA (znakowanie jak w hybrydocytochemii); *Northern blotting* wykrywa RNA (znakowanie jak w hybrydocytochemii); *Western blotting* wykrywa białka (znakowanie jak w immunocytochemii).

Hybrydyzacja (kwasów nukleinowych)

Wysoce swoiste łączenie się komplementarnych fragmentów pojedynczych łańcuchów kwasów nukleinowych. Umożliwia wykrycie odcinka DNA lub RNA o określonej sekwencji nukleotydów za pomocą znakowanej sondy DNA lub RNA o komplementarnej sekwencji nukleotydów – w materiale przygotowanym zarówno do badań biochemicznych, jak i mikroskopowych (hybrydocytochemia, hybrydyzacja *in situ*).

PCR – łańcuchowa reakcja polimerazowa

Metoda umożliwiająca wykrycie i identyfikację śladowych ilości DNA (nawet pojedynczych cząsteczek); wykorzystuje się tu polimerazę, enzym replikujący DNA w urządzeniach zwanych cyklerami. Reakcja pozwala na namnożenie poszukiwanych odcinków DNA, który następnie można wykrywać innymi metodami.

RT-PCR

Metoda umożliwiająca wykrycie i identyfikację śladowych ilości RNA dzięki odwrotnej transkryptazie – enzymowi syntetyzującemu DNA na matrycy RNA. W wyniku tego powstaje łańcuch komplementarnego DNA (cDNA), który jest następnie powielany za pomocą PCR.

Cytochemia

Barwienie *in situ* konkretnych związków i substancji chemicznych, których rozmieszczenie pozwala na wgląd w procesy toczące się w komórce i jej otoczeniu.

Immunocytochemia

Metoda, która opiera się na bardzo wysokiej swoistości wiązania antygenu z przeciwciałem, znakowanych przez przyłączenie do nich substancji widocznych w obrazie mikroskopowym. Pozwala wykrywać pojedyncze rodzaje białek występujących w obrębie komórek i substancji międzykomórkowej.

Metoda FRET

Metoda umożliwiająca uwidocznienie interakcji pomiędzy cząsteczkami znakowanymi fluorescencyjnie, oparta na bezpośrednim przekazaniu energii z jednego fluorochromu na drugi.

Cytometria przepływowa

Metoda ilościowej oceny właściwości fizycznych i chemicznych komórek, które pojedynczo przepływają przez miejsce pomiaru. Do badań używa się odpowiednio znakowane zawiesiny komórkowe, np. limfocyty znakowane przeciwciałami.

Wstęp

Biologia komórki jest jedną z najbardziej zaawansowanych i najszybciej się rozwijających dziedzin nauk przyrodniczych. Współczesne badania w tej dziedzinie koncentrują się przede wszystkim na powiązaniach między strukturą i funkcją komórek, co od badacza wymaga znajomości bardzo zróżnicowanego warsztatu metodycznego. Osiągnięcie wartościowych wyników badań, w sposób istotny poszerzających naszą wiedzę, wymaga prawie zawsze dostosowania metodyki do problemu, który chce się rozstrzygnąć i wykorzystania zestawu różnych technik, które w najpełniejszy sposób udzielą odpowiedzi na postawione w eksperymencie pytania.

Niektóre metody stosowane w badaniach eksperymentalnych są również wykorzystywane w diagnostyce medycznej, a w ostatnich latach zaczęły odgrywać istotną rolę w zaawansowanych formach terapii (wytwarzanie przeciwciał monoklonalnych, celowane niszczenie komórek nowotworowych, terapia genowa).

Metody przygotowania komórek do badań

Sposób uzyskania i przygotowania komórek do badań zależy od ich dostępności i rodzaju zaplanowanych badań. Najprościej uzyskać komórki, które w naturalnych warunkach są zawieszone w płynach ustrojowych (komórki krwi, chłonki, płynu mózgowo-rdzeniowego, itp.). Ogromna większość komórek jest jednak integralną częścią tkanek i narządów, w których komórki są mniej lub bardziej ściśle powiązane ze sobą i ze składnikami substancji międzykomórkowej.

Izolacja komórek

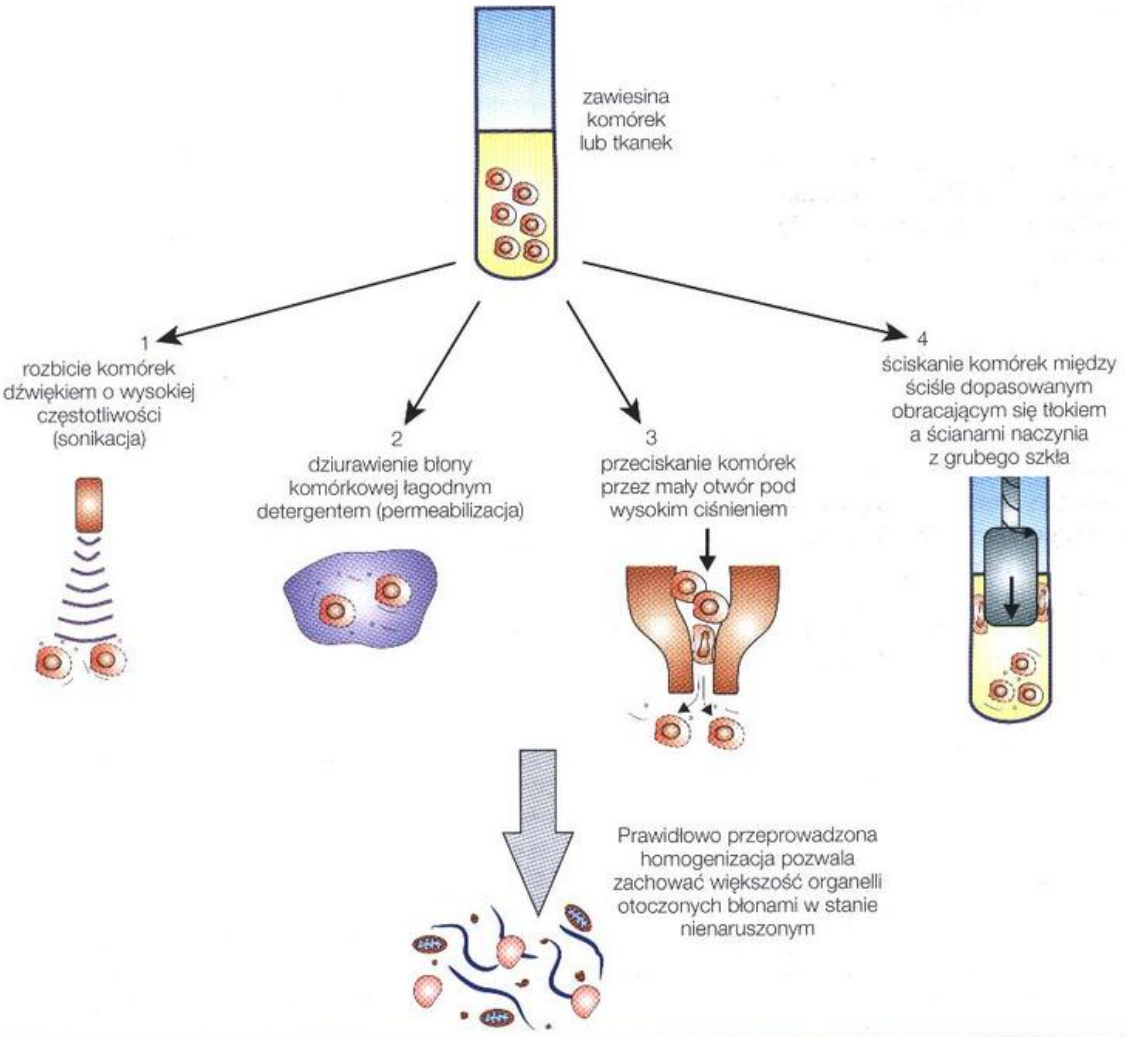
Wiele badań – głównie biochemicznych, ale także mikroskopowych – wymaga uzyskania zawiesiny homogennej populacji komórek. Uzyskuje się ją przez delikatne, mechaniczne rozdrobnienie fragmentu tkanki lub narządu, a następnie potraktowanie tak przygotowanego materiału enzymami trawiącymi wiążącą komórki substancję międzyko-

mórkową. Końcowym etapem procedury – noszącej nazwę izolacji komórek – jest zazwyczaj łagodne wirowanie, pozwalające na oddzielenie komórek nieuszkodzonych od fragmentów komórek, które zostały zniszczone podczas rozdrabniania materiału. Z uzyskanej w ten sposób zawiesiny komórek można w kolejnym etapie wyizolować komórki określonego typu przez zastosowanie cytometru przepływowego wyposażonego w sortownik komórek (zob. *Cytometria przepływowa*).

Homogenizacja i frakcjonowanie komórek

Do badań biochemicznych i molekularnych zazwyczaj niezbędne jest zniszczenie integralności komórki: przerwanie ciągłości błony komórkowej w celu uzyskania zawartości cytoplazmy i zlokalizowanych w niej organelli komórkowych. W tym celu fragment narządu lub izolowane komórki poddaje się homogenizacji – bardzo dokładnemu rozdrobnieniu w płynie mechanicznemu lub za pomocą ultradźwięków, w wyniku którego uzyskuje się homogenat – zawiesinę składników komórkowych (ryc. 15.1). W zależności od warunków homogenizacji, w zawiesinie mogą się znajdować nieuszkodzone organelle i struktury wewnątrzkomórkowe (jądra, mitochondria, lizosomy, pęcherzyki wydzielnicze itp.) lub też jedynie ich fragmenty.

Różniące się masą struktury wewnątrzkomórkowe można następnie poddać selektywnej izolacji, stosując metodę frakcjonowania (wirowania różnicowego), która polega na kilkakrotnym wirowaniu homogenatu, przy każdorazowo wzrastającej



Rycina 15.1 Najczęściej stosowane metody homogenizacji komórek (wg B. Alberts).

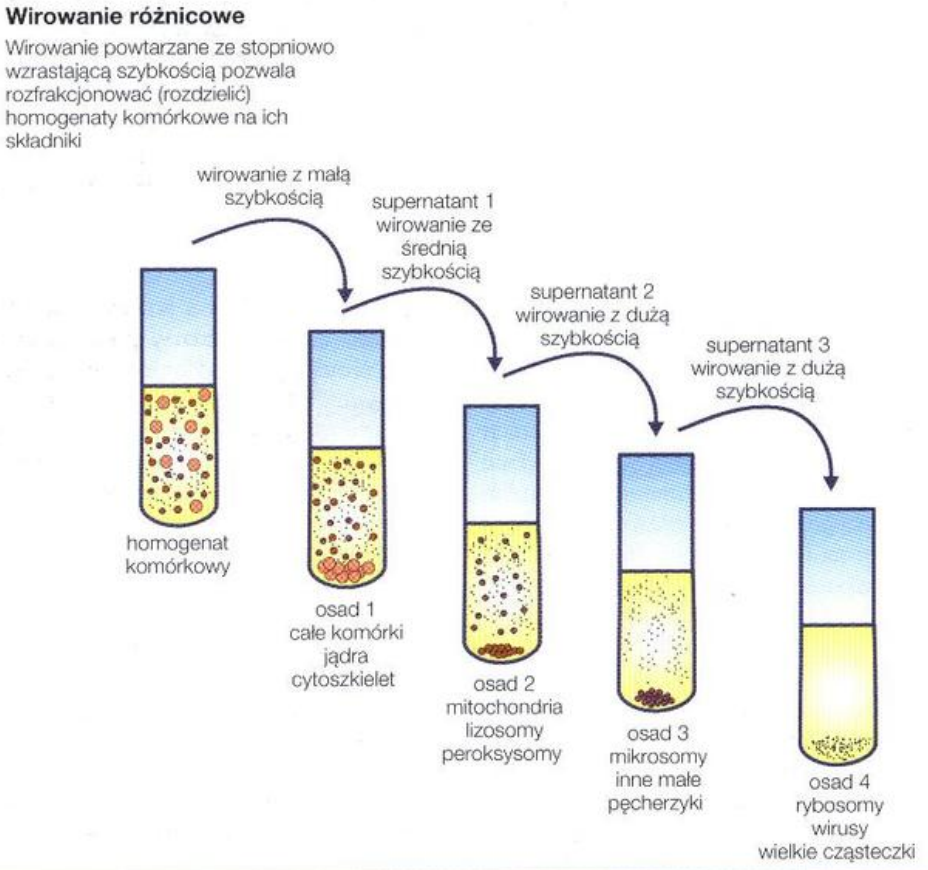
prędkości obrotowej (ryc. 15.2). Po każdym cyklu wirowania oddziela się osad zawierający najcięższe organelle, a część płynną (nadsącz) wiruje się ponownie. Otrzymuje się zatem kolejne frakcje zawierające struktury wewnątrzkomórkowe o coraz mniejszej masie – można w ten sposób wyizolować poszczególne organelle, stanowiące materiał do dalszych badań. Podobny efekt można uzyskać, stosując wirowanie w środowisku (sacharoza, chlorek cezu) o wzrastającej gęstości (tzw. wirowanie w gradiencie gęstości) – frakcje różniące się masą tworzą wówczas w probówce wyodrębnione na różnej wysokości warstwy.

Materiałem badawczym jest również nadsącz, do którego przechodzą substancje chemiczne uwolnione z uszkodzonych organelli lub zawarte w płynnej części cytoplazmy.

Hodowla komórek

Hodowla komórek jest zarówno metodą badawczą, jak i sposobem przygotowania określonej populacji komórkowej do dalszych badań. Wyizolowane z organizmu komórki można utrzymywać przy życiu poza ich naturalnym mikrośrodowiskiem (*in vitro*) przez umieszczenie ich w pożywkach, zawierających niezbędne do metabolizmu komórkowego substancje odżywcze, regulacyjne i jony oraz zapewnienie odpowiednich warunków fizycznych (temperatura, wilgotność, stężenie gazów). W takich warunkach komórki nie tylko pełnią charakterystyczne dla siebie funkcje (np. wytwarzają i wydzielają odpowiednie substancje chemiczne), ale także namnażają się, a w wielu przypadkach mogą posłużyć do zakładania kolejnych hodowli (linie komórkowe).

Hodowla stwarza możliwość obserwacji procesów zachodzących w żyjących komórkach i śledzenia na bieżąco ich dynamiki. Hodowane komórki, pozbawione kontrolnego i regulacyjnego wpływu innych komórek obecnych w naturalnym mikrośrodowisku organizmu (*in vivo*), są doskonałym modelem do wszechstronnych badań dotyczących funkcjonowania aparatu genetycznego, proliferacji, różnicowania, wewnątrzkomórkowych



Rycina 15.2 Otrzymywanie frakcji subkomórkowych metodą wirowania różnicowego (wg B. Alberts).

procesów metabolicznych, działania substancji regulacyjnych, leków, toksyn i czynników rakotwórczych itp. W medycynie, pobrane od pacjenta i hodowane komórki mogą z jednej strony służyć do celów diagnostycznych (wykrywanie defektów genetycznych czy zaburzeń metabolizmu komórkowego), z drugiej zaś stanowią dobry materiał do autoprzeszczepów (hodowla komórek naskórka wykorzystywana w leczeniu dużych ubytków skóry, hodowla macierzystych komórek mięśnia sercowego, następnie przeszczepianych w obręb blizny pozawałowej – na razie na etapie badań przedklinicznych). W hodowanych komórkach można też dokonywać korekt genomu metodami inżynierii genetycznej – w ten sposób udało się np. przekształcić fibroblasty w komórki macierzyste zbliżone własnościami do zarodkowych komórek macierzystych.

W warunkach hodowli można również łączyć ze sobą odmienne rodzaje komórek. Zjawisko to, polegające na połączeniu błon komórkowych i zespoleniu cytoplazmy dwóch komórek różnego typu pod wpływem dodanych do hodowli czynników nazywa się **fuzją** komórek. Dalsza hodowla prowadzi do połączenia genomów, czyli **hybrydyzacji**, komórek, które uległy fuzji. Hybrydy komórkowe są atrakcyjnym obiektem badań genetycznych, są również źródłem przeciwciał monoklonalnych (zob. *Immunocytochemia*), szeroko wykorzystywanych w badaniach immunochemicznych.

Hodowane komórki są łatwo dostępne i można je wykorzystać do badań zarówno biochemicznych, molekularnych, jak i mikroskopowych.

Przygotowanie komórek do badań *in situ*

Pobranie fragmentu tkanki lub narządu umożliwia badanie komórek w ich naturalnej lokalizacji i mikrośrodowisku, co określa się terminem *in situ* (w miejscu). Najlepiej nadają się do tego techniki mikroskopowe. Rutynowa procedura przygotowania materiału do takich badań obejmuje kilka etapów.

1. Pobrany materiał poddaje się procesowi **utrwalenia** – jego istotą jest zapobieżenie procesom autolitycznym, które zmieniają zarówno strukturę, jak i skład chemiczny materiału. Stosuje się w tym celu czynniki chemiczne (aldehydy, alkohole, kwasy organiczne, sole metali ciężkich) i/lub fizyczne (mikrofale). Powodują one inaktywację większości enzymów i zachowanie niezmienionej struktury komórek i ich otoczenia. Najpowszechniej stosowanymi utrwalaczami są aldehyd mrówkowy (formalina) do badań w mikroskopie świetlnym oraz aldehyd glutarowy do badań w mikroskopie elektronowym. Podobny do utrwalenia efekt daje szybkie zamrożenie materiału do bardzo niskiej temperatury (np. w ciekłych gazach) – wówczas komórki można przechowywać przez długi czas w pojemnikach z ciekłym azotem bez obaw uszkodzenia ich struktury lub zmiany składu chemicznego. Co więcej, zamrożone w odpowiednich warunkach komórki zachowują po rozmrożeniu żywotność.
2. Utrwalony materiał przepaja się substancją, która następnie zostaje utwardzona (parafina, żywice akrylowe i epoksydowe) – proces ten nosi nazwę **zatapiania**.
3. Utwardzony (zatopiony lub zamrożony) materiał nadaje się do **krojenia** na skrawki – na tyle cienkie, aby mogły przez nie przechodzić promienie świetlne lub strumień elektronów (1–10 μm do mikroskopii świetlnej, 20–50 nm do mikroskopii elektronowej).

Badania biochemiczne i molekularne

Celem badań za pomocą metod biochemicznych i molekularnych jest wyizolowanie z komórek lub substancji międzykomórkowej oraz identyfikacja i następowe określenie charakterystyki konkretnych substancji chemicznych. Dotyczy to przede wszystkim kwasów nukleinowych i białek, ze względu na znaczenie, jakie mają w funkcjonowaniu komórki.

Elektroforeza białek i kwasów nukleinowych

Elektroforeza – **zjawisko poruszania się cząstek obdarzonych ładunkiem w polu elektrycznym** – jest wykorzystywana do rozdziału mieszanin białek i kwasów nukleinowych dzięki temu, że różne białka i odcinki kwasów nukleinowych mają w swych cząsteczkach odmienne liczby i rodzaje ładunków i charakterystyczną dla siebie szybkość wędrówki w kierunku jednego z biegunów pola. Szybkość ta zależy również od wielkości i kształtu cząsteczki oraz od lepkości środowiska, w którym się ona porusza. A zatem po odpowiednim czasie elektroforezy nastąpi rozdział mieszaniny wzdłuż linii pola elektrycznego: każdy z jej składników znajdzie się w innym miejscu. Jeżeli elektroforezę prowadzi się na podłożu stałym, wyodrębnioną w ten sposób substancję można łatwo wyizolować, np. po wycięciu fragmentu podłoża, na którym się znajduje.

W przypadku **kwasów nukleinowych** najpowszechniej stosuje się elektroforezę na **żelach agarozowych**, przy czym DNA poddaje się przed elektro-

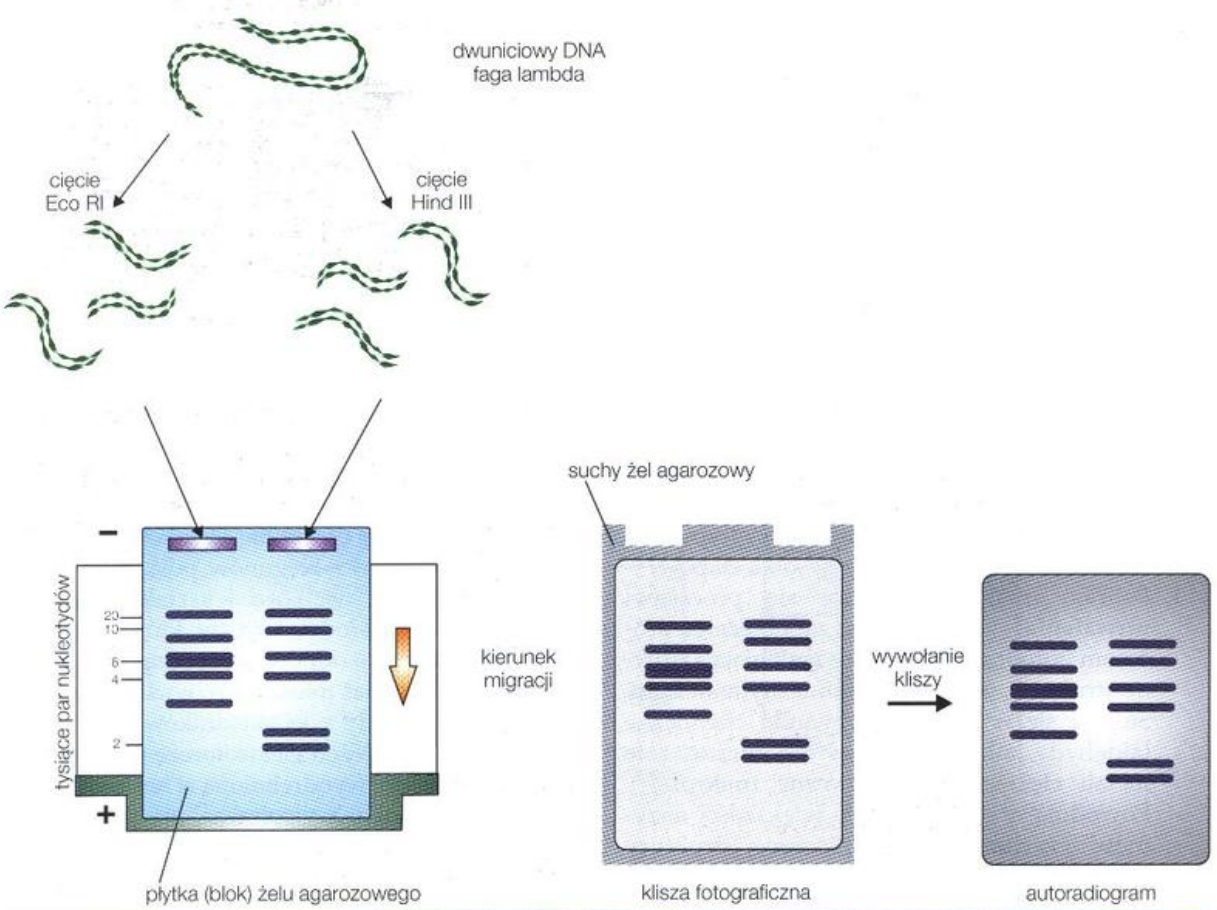
forezą fragmentacji na stosunkowo krótkie odcinki za pomocą nukleaz restrykcyjnych, które przecinają łańcuch DNA w określonych miejscach (ryc. 15.3).

Najpopularniejszą metodą rozdziału **białek** jest elektroforeza na żelu poliakrylamidowym w obecności dodecylosiarczanu sodu (ang. **SDS-PAGE** – *sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis*). SDS jest anionowym detergentem (ryc. 15.4). Wywołuje on dwa efekty: 1. powoduje rozdzielenie kompleksów białkowych na pojedyncze cząsteczki, które są denaturowane (rozwinięte w linearny łańcuch polipeptydowy) oraz 2. przez przyłączenie się do aminokwasów takiego łańcucha cząsteczki SDS nadają mu znaczny ładunek ujemny, którego sumaryczna wielkość zależy jedynie od liczby aminokwasów, czyli od masy cząsteczkowej białka. Elektroforeza tak przygotowanej mieszaniny białek powoduje ich rozdział zgodnie z rozkładem mas cząsteczkowych, które można oznaczyć, porównując położenie badanego białka z położeniem białek standardowych (o znanej masie cząsteczkowej).

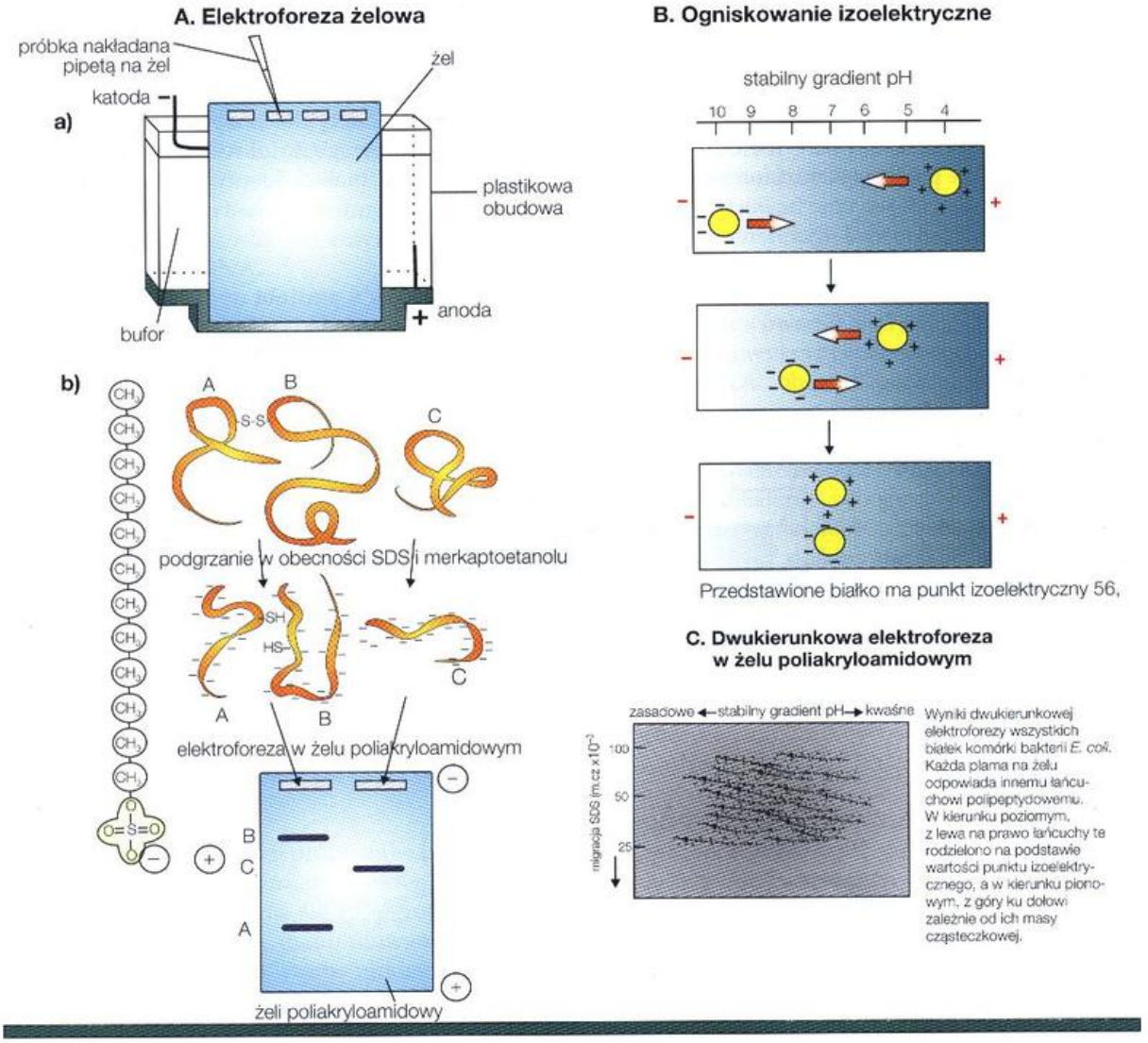
Największą efektywność w przypadku rozdziału mieszaniny bardzo wielu białek wykazuje tzw. **elektroforeza dwukierunkowa**. W pierwszym etapie wykonuje się tzw. ogniskowanie izoelektryczne, czyli elektroforezę w gradiencie pH, która powoduje zatrzymanie danego białka w miejscu, gdzie pH jest równe jego punktowi izoelektrycznemu. Tak rozdzielone białka poddaje się następnie procesowi SDS-PAGE, przy czym kierunek rozdziału jest prostopadły do kierunku uprzedniego ogniskowania. W ten sposób uzyskuje się rozdział na dwuwymiarowej płaszczyźnie, pozwalający na wyodrębnienie nawet ok. 1000 białek z pojedynczej próbki.

Identyfikacja rozdzielonych białek i kwasów nukleinowych

Standardowo używaną metodą identyfikacji rozdzielonych w procesie elektroforezy białek i kwasów nukleinowych jest tzw. *blotting* (odciskanie) – oznaczający w języku angielskim odciśnięcie plamy na bibule. Metodę tę opracował E.M. So-



Rycina 15.3 Elektroforeza kwasów nukleinowych (wg B. Alberts).



Wyniki dwukierunkowej elektroforezy wszystkich białek komórki bakterii *E. coli*. Każda plama na żelu odpowiada innemu łańcuchowi polipeptydowemu. W kierunku poziomym, z lewa na prawo łańcuchy te rodzielono na podstawie wartości punktu izoelektrycznego, a w kierunku pionowym, z góry ku dołowi zależnie od ich masy cząsteczkowej.

A.

a) Cząsteczki białek w polu elektrycznym migrują z szybkością zależną od ich masy cząsteczkowej i wypadkowego ładunku; od tego ostatniego zależy też kierunek ruchu. Zjawisko to jest podstawą techniki nazywanej elektroforezą.

b) Obecność detergentu SDS (dodecylosiarczanu sodu) ma na celu solubilizację białek poddawanych elektroforezie w żelu poliakryloamidowym.

Elektroforeza w żelu poliakryloamidowym w obecności SDS (SDS-PAGE). Poszczególne łańcuchy polipeptydowe tworzą kompleks z cząsteczkami dodecylosiarczanu sodu (SDS) obdarzonymi ładunkiem ujemnym i migrują przez umieszczony między płytami porowaty żel poliakryloamidowy jako obdarzone ładunkiem ujemnym kompleksy białka i SDS. W punkcie **(a)** przedstawiono aparat stosowany w tej technice elektroforezy. Aby rozbić wiązania dwusiarczkowe istniejące w obrębie białek lub między nimi, stosuje się czynnik redukujący (merkaptoetanol) **(b)**. W tych warunkach białka migrują z szybkością zależną od ich masy cząsteczkowej.

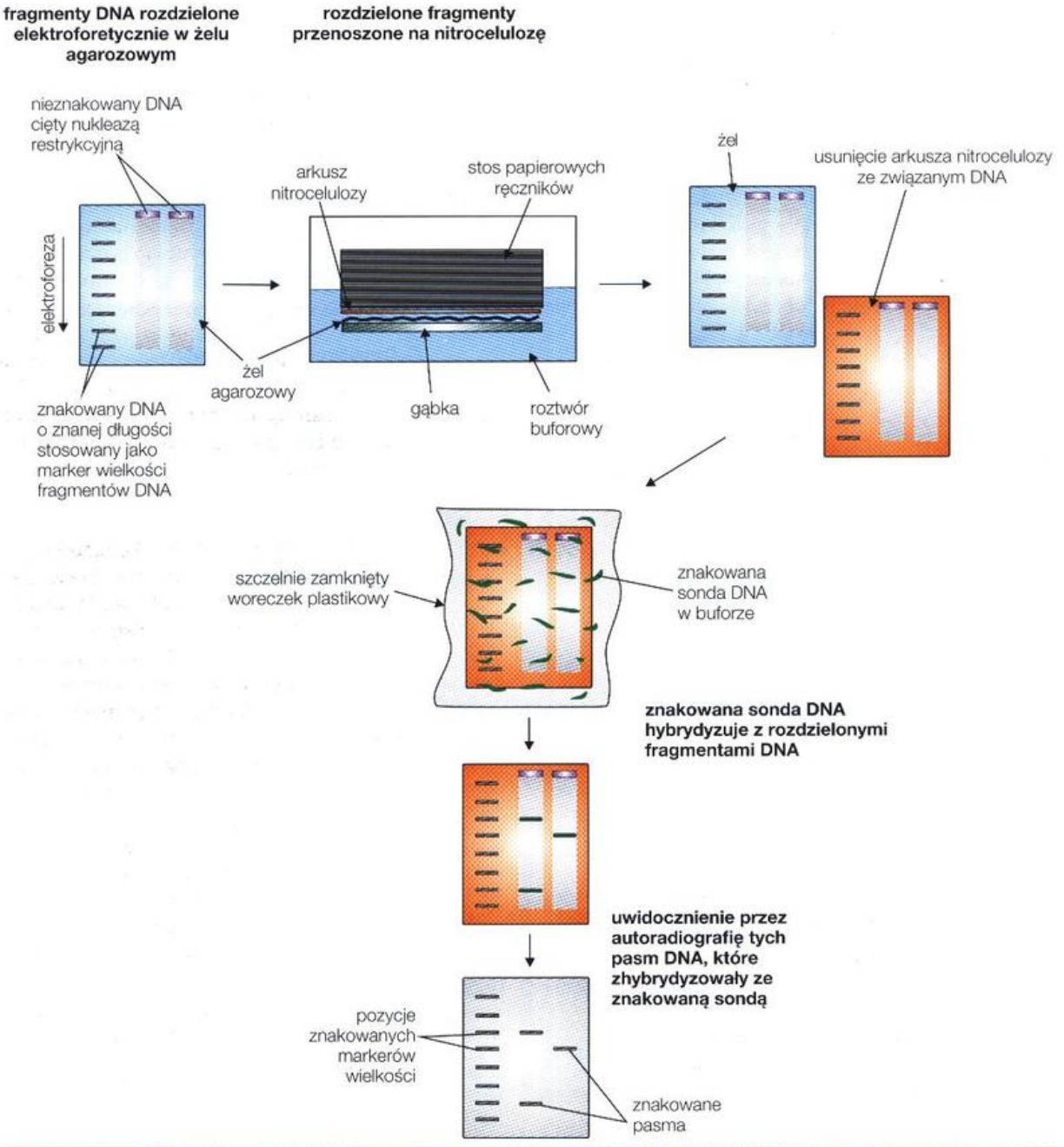
B. Dla każdego białka istnieje charakterystyczna wartość pH, nazywana punktem izoelektrycznym, przy której ładunek wypadkowy białka wynosi zero, co powoduje brak migracji tego białka w polu elektrycznym. W ogniskowaniu izolelektrycznym białka poddaje się elektroforezie w wąskich rurkach z żelem poliakryloamidowym, zawierającym gradient pH, ustalony przez mieszanie specjalnych buforów. Każde białko zatrzymuje się w żelu po dotarciu do miejsca o pH równym pH jego punktu izoelektrycznego.

C. Złożonej mieszaniny białek nie można dobrze rozdzielić na jednokierunkowym żelu. Dwukierunkowa elektroforeza żelowa, łącząca w sobie dwie różne metody rozdziału, pozwala rozdzielić ponad tysiąc białek do postaci dwuwymiarowej mapy. W pierwszym etapie, wykorzystującym ogniskowanie izolelektryczne, natywne białka rozdziela się w wąskich rurkach z żelem na podstawie ich ładunku wypadkowego **(B.)**. Następnie żel wyciągnięty z rurki umieszcza się na szczycie żelu zawartego między szybami i białka poddaje się rozdziałowi metodą SDS-PAGE **(A.)** w kierunku prostopadłym do użytego w pierwszym etapie. Każde białko migrując tworzy odrębną plamę.

Rycina 15.4 Podstawowe metody elektroforezy białek (wg B. Alberts).

uthern dla DNA i nadano jej nazwę *Southern blotting* (ryc. 15.5). Potem zaadaptowano ją dla RNA i białek, a ponieważ *southern* oznacza południowy, modyfikacje nazwano żartobliwie *Northern* i *Western* (północny i zachodni).

Zasada wszystkich odmian metody jest taka sama: rozdzielone podczas elektroforezy substancje przenosi się z żelu (przez odciśnięcie w obecności tzw. roztworu ekstrakcyjnego) na błonę nitrocelulozową lub nylonową, która zachowuje ich rozmieszczenie, ale jest lepszym niż żel podłożem do następowej identyfikacji wykrywanego odcinka kwasu nukleinowego (o określonej sekwencji nukleotydów) lub białka. Identyfikacji dokonuje się



Rycina 15.5 Metody *Southern blotting* (wg B. Alberts).

przez inkubację takiej błony w roztworze zawierającym znakowane substancje, swoiście rozpoznające wykrywane makrocząsteczki:
- w metodzie ***Southern blotting*** wykrywającej pojeidyncze, krótkie łańcuchy DNA, stosuje się znakowane sondy DNA lub RNA (zob. *Hybrydyzacja kwasów nukleinowych*),
- w metodzie ***Northern blotting*** wykrywającej cząsteczki RNA stosuje się również znakowane sondy RNA lub DNA,
- w metodzie ***Western blotting*** wykrywającej białka stosuje się swoiste, znakowane przeciwciała (zob. *Immunocytochemia*).

Sondy i przeciwciała są znakowane albo izotopami promieniotwórczymi, albo – podobnie jak w metodach immunocytochemicznych i hybrydocytochemicznych – znacznikami fluorescencyjnymi, antygenowymi lub enzymami. Ostatnim etapem metody jest uwidocznienie miejsca związania sondy: jeżeli zastosowano znakowanie izotopem, na błonę nakłada się emulsję światłoczułą (zob. *Autoradiografia*), w przypadku znakowania antygenowego lub enzymem przeprowadza się reakcje barwne używane w immunocytochemii.

Metodyka ta charakteryzuje się bardzo wysoką czułością; pozwala na identyfikację skrajnie małych ilości (rzędu 10 pg) wykrywanych substancji.

Manipulowanie DNA

Jednym z najistotniejszych problemów badawczych w biologii komórki jest funkcjonowanie aparatu genetycznego. Wykorzystuje się tu szeroki wachlarz metod umożliwiających manipulowanie zawierającymi geny odcinkami kwasów nukleinowych, ich izolację i identyfikację.

Łańcuch DNA może być cięty na fragmenty przez **nukleazy restrykcyjne** – bakteryjne enzymy przecinające DNA w miejscach o ściśle określonej sekwencji nukleotydów. Takie fragmenty (np. zawierające różne geny) można potem dowolnie łączyć, tworząc **rekombinowany DNA**.

Odcinki DNA komórki można wielokrotnie powielać (**klonować**) poprzez włączenie ich do plazmidów (pozachromosomowych cząsteczek DNA obecnych w komórkach bakteryjnych) i następową hodowlę bakterii. W ten sposób tworzone są **biblioteki DNA** – zbiory fragmentów DNA danego organizmu. Genomowe biblioteki DNA zawierają odcinki całego DNA komórki, łącznie z jego niekodującymi obszarami. Biblioteki cDNA (komplementarnego DNA) powstają przez klonowanie odcinków DNA wytworzonych na matrycach mRNA z użyciem odwrotnych transkryptaz (enzymów syntetyzujących nić DNA na matrycy RNA). Odcinki te zawierają zatem tylko geny, które ulegają ekspresji w komórce. Biblioteki DNA umożliwiają dostęp do kompletnego materiału genetycznego różnych organizmów, ułatwiając prowadzenie badań.

DNA zawierający określone geny może być sztucznie wprowadzany do komórek – określa się to mianem **transfekcji**. Wprowadzone geny zostają włączone do genomu komórki i w zależności od ich charakteru (gen może być prawidłowy, zmutowany lub inaktywowany) wpływają na jej czynność. Do transfekcji wykorzystuje się wirusy z włączonymi do ich DNA „obcymi" genami, a także metody, dzięki którym przejściowo zwiększa się przepuszczalność błony komórkowej, umożliwiając bezpośrednie wprowadzenie DNA do komórki, np. elektroporację (działanie silnego pola elektrycznego), czy sonoporację (działanie ultradźwiękami). Można też „wstrzeliwać" do komórki nanocząsteczki złota, do których przyłączony jest wprowadzany DNA. Transfekcja zarodkowych komórek macierzystych i ich następowe wszczepienie do blastocysty, którą umieszcza się w macicy, prowadzi do wyhodowania **zwierząt transgenicznych** – posiadających dodatkowe, zmodyfikowane lub inaktywowane (znokautowane) geny.

Sekwencjonowanie DNA

Sekwencjonowanie, czyli ustalanie kolejności par nukleotydów w cząsteczce DNA, wg klasycznej metody Sangera (dzięki której zsekwencjonowano ludzki genom) przeprowadza się w procesie syntezy komplementarnego łańcucha DNA z udziałem polimerazy DNA i w obecności znakowanych dideoksynukleotydów – homologów naturalnych nukleotydów, które wbudowują się do nowo tworzonej nici DNA, ale uniemożliwiają jej dalsze wydłużanie. Uzyskuje się zatem wiele fragmentów DNA o różnej długości, a każdy z nich jest zakończony znakowanym dideoksynukleotydem. Przeprowadza się jednocześnie cztery takie reakcje – w każdej z nich uczestniczy inny dideoksynukleotyd z dołączonym odrębnym znacznikiem (np. emitującym fluorescencję o określonej barwie). Wytworzone w tym procesie fragmenty DNA rozdziela się elektroforetycznie, uzyskując ich liniowy rozkład – od najdłuższego do najkrótszego. Analiza lokalizacji poszczególnych dideoksynukleotydów w zestawionych ze sobą czterech takich rozkładach umożliwia odczytanie ich sekwencji w całej nici DNA.

Wszystkie etapy procesu odbywają się w zautomatyzowanych urządzeniach, sekwencerach. W osta-

tnich latach wprowadzono kilka modeli tych urządzeń działających na innych zasadach i umożliwiających szybsze i tańsze sekwencjonowanie DNA, określane mianem sekwencjonowania następnej generacji (ang. *next-generation sequencing*).

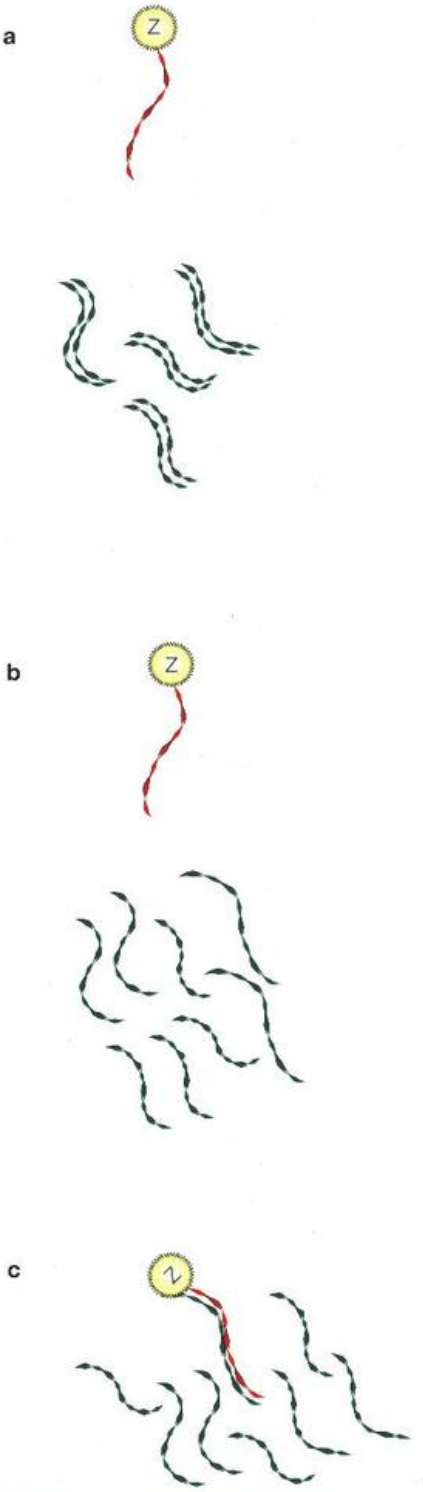
Hybrydyzacja kwasów nukleinowych

Pod wpływem wysokiej temperatury następuje denaturacja DNA – rozdzielenie jego dwóch nici. Jednoniciowe odcinki kwasów nukleinowych, także pochodzące z różnych źródeł, łączą się ze sobą pod warunkiem, że ich sekwencje nukleotydów są komplementarne – zjawisko to nosi nazwę **hybrydyzacji**. Pozwala ono na identyfikację określonych sekwencji nukleotydów w łańcuchach DNA i RNA. Służą do tego **sondy** – zsyntetyzowane odcinki DNA lub RNA o komplementarnej sekwencji nukleotydów, znakowane znacznikami chemicznymi lub izotopami promieniotwórczymi (do syntezy sondy używa się nukleotydów z wbudowanymi atomami promieniotwórczych pierwiastków), co umożliwia ich późniejsze wykrycie (ryc. 15.6). Korzystając z tej techniki, wykrywa się w DNA konkretne geny, można ustalić liczbę ich kopii, a także – poprzez badanie mRNA – ich ekspresję. Hybrydyzację można też przeprowadzić w materiale przygotowanym do badań mikroskopowych (zob. *Hybrydocytochemia*).

Jednoczesną identyfikację i analizę ekspresji tysięcy genów umożliwiają **mikromatryce DNA**. Są to wyprodukowane z zastosowaniem bardzo zaawansowanej technologii płytki wielkości szkiełka mikroskopowego, na których rozmieszczono w regularnym układzie tysiące lub nawet dziesiątki tysięcy jednoniciowych fragmentów DNA (sond) odpowiadających poszczególnym genom. Pokrywa się je wyekstrahowanymi z badanych komórek odcinkami DNA lub cDNA, wyznakowanymi uprzednio fluorochromami. Miejsca, w których doszło do hybrydyzacji tych odcinków z sondami mikromatrycy, emitują fluorescencję, a ponieważ w mikromatrycy znana jest pozycja każdej sondy, możliwa jest identyfikacja genu. Fluorescencja i jej lokalizacja odczytywane są przez zautomatyzowane skanery mikromatryc wyposażone w oprogramowanie umożliwiające zapisywanie i analizę wyników.

Łańcuchowa reakcja polimerazowa

Jest to metoda (ang. PCR – *polymerase chain reaction*) umożliwiająca wykrycie i identyfikację **śladowych ilości kwasów nukleinowych** (nawet pojedynczych cząsteczek), w przypadku których inne



Rycina 15.6 Proces hybrydyzacji: **a.** sonda DNA ze znacznikiem (z) nie może się związać z dwuniciowym DNA, **b.** po denaturacji DNA jądrowy przechodzi w formę jednoniciową, **c.** znakowana sonda wiąże się z odcinkiem DNA mającym komplementarną sekwencję nukleotydów.

metody są niewystarczająco czułe. Wykorzystuje enzym replikujący DNA, polimerazę, a metoda polega na przeprowadzeniu w badanym materiale wielu następujących po sobie cykli syntezy DNA identycznego pod względem sekwencji nukleotydów z wykrywanym odcinkiem. W wyniku takiego postępowania liczba syntetyzowanych odcinków DNA narasta wykładniczo, co pozwala na uzyskanie na tyle znacznych ilości DNA, że można go wykryć dostępnymi metodami i przeprowadzić dalsze analizy (np. sekwencjonowanie).

Jeżeli przedmiotem badań jest RNA, przeprowadza się zmodyfikowany wariant tej reakcji: **RT-PCR** (ang. *reverse transcriptase-PCR*). W pierwszym etapie do środowiska reakcji wprowadza się odwrotną transkryptazę. W wyniku jej działania powstaje łańcuch DNA o komplementarnej w stosunku do wykrywanego RNA sekwencji nukleotydów. Łańcuch ten jest następnie powielany z użyciem PCR. Do przeprowadzania PCR służą specjalne urządzenia, tzw. cyklery.

Metody pomiaru stężeń i przepływu jonów za pomocą mikroelektrod

Za pomocą mikromanipulatora można, przebijając błonę komórkową, umieścić w cytoplazmie pojedynczej komórki mikroelektrodę zaopatrzoną w filtr selektywnie przepuszczający tylko określone jony. Taka elektroda reaguje na zmiany wewnątrzkomórkowego stężenia jonów, umożliwiając jego pomiar.

Nieco innych elektrod używa się w technice „łatkowej" (ang. *patch-clamp technique*), umożliwiającej badanie czynności pojedynczych kanałów jonowych (ryc. 15.7). Elektrody te nie przebijają błony komórkowej, tylko przywierają do niej, tworząc styk z bardzo małym obszarem błony („łatka"). Jeżeli na takim obszarze znajduje się kanał jonowy, elektroda rejestruje przepływ jonów przez ten kanał. Można również oderwać fragment błony przywarty do końcówki mikroelektrody i badać zachowanie kanału jonowego w warunkach eksperymentu pozakomórkowego.

Badania mikroskopowe

Obserwacje mikroskopowe, umożliwiające powiązanie strukturalnych i czynnościowych aspektów procesów zachodzących w komórkach, są bardzo istotnym nurtem badań w biologii komórki, a stosowane współcześnie techniki badań mikroskopowych wykorzystują także osiągnięcia biochemii i biologii molekularnej.

Mikroskopy świetlne

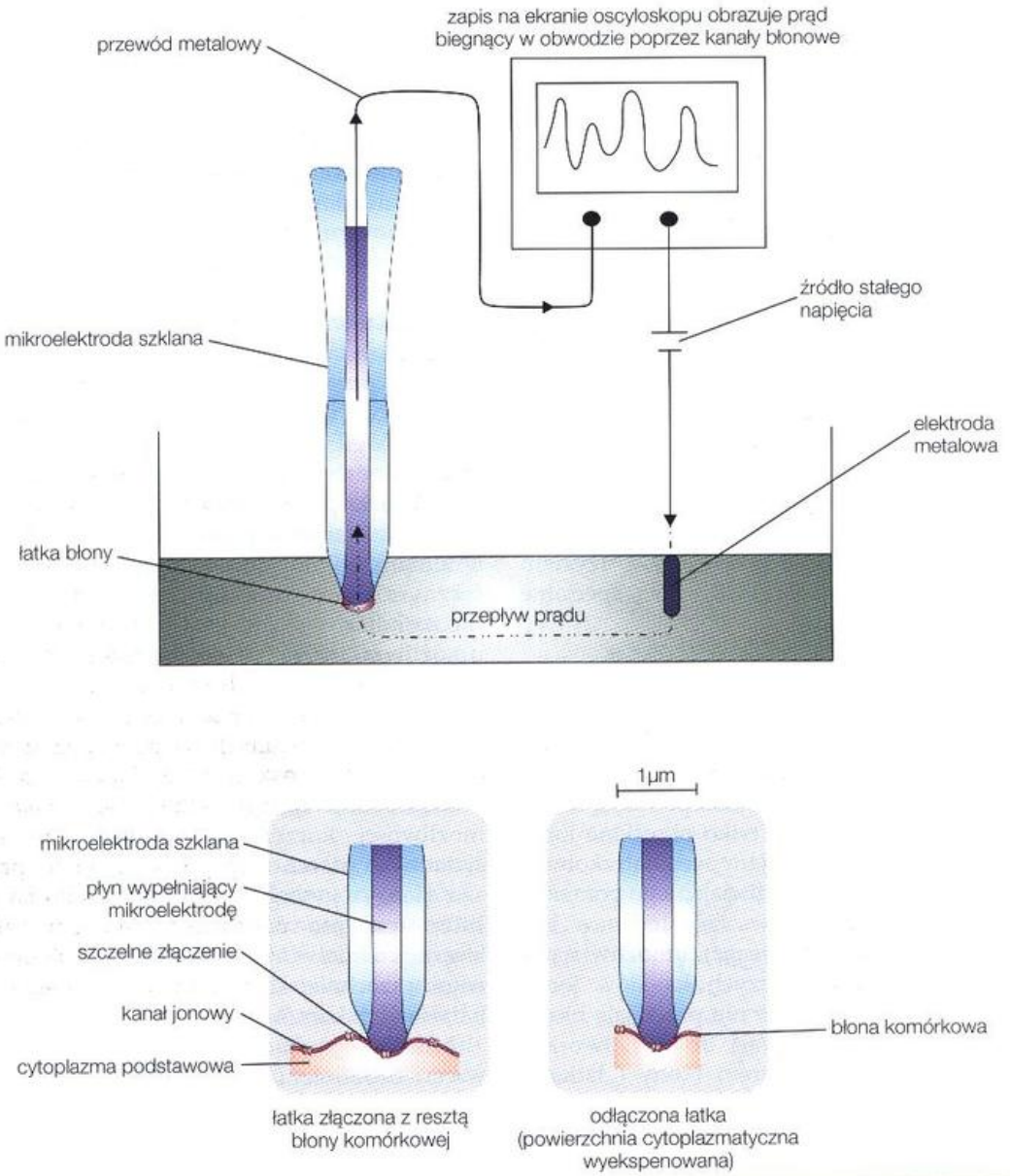
Klasyczny mikroskop świetlny wykorzystuje trzy główne składniki układu optycznego: kondensor, obiektyw i okular, do wytworzenia pozornego, odwróconego i powiększonego obrazu (ryc. 15.8). Jego **zdolność rozdzielcza** (najmniejsza odległość między dwiema wyodrębnionymi w obrazie strukturami), warunkowana przede wszystkim długością fali świetlnej i wynosząca **0,2 μm**, ogranicza wprawdzie możliwości dokładnych obserwacji struktur wewnątrzkomórkowych, ale w przypadku wielu zagadnień badawczych informacje uzyskiwane na poziomie mikroskopu świetlnego są wystarczające.

W biologii komórki często wykorzystuje się specjalne odmiany mikroskopu świetlnego:

Mikroskop fazowo-kontrastowy pozwala na przekształcenie przesunięć fazy fali świetlnej w zmiany jej amplitudy, czyli w wymiarze praktycznym kontrastuje struktury, które w zwykłym mikroskopie są przejrzyste i słabo widoczne; umożliwia zatem obserwacje komórek żywych, których – z wyjątkiem szczególnych przypadków – nie można zabarwić typowymi barwnikami histologicznymi bez ich uszkodzenia lub wręcz uśmiercenia.

Mikroskop interferencyjny stwarza podobne możliwości, korzystając z interferencji promieni świetlnych przechodzących przez preparat; najlepsze, quasi-trójwymiarowe obrazy daje tzw. **kontrast interferencyjno-różnicowy Nomarskiego** (DIC, ang. *differential interferencje contrast*), obecnie chyba najpowszechniej stosowany do obserwacji niezabarwionych komórek.

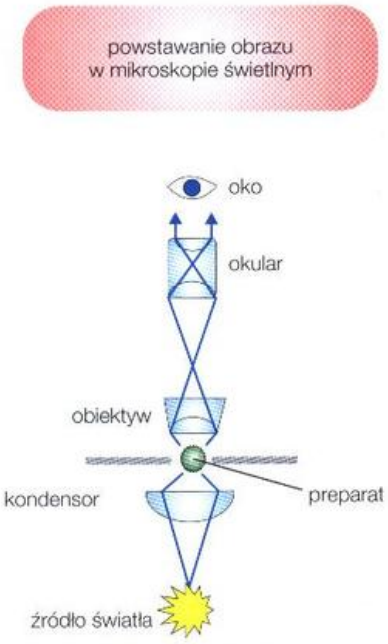
Mikroskop fluorescencyjny, dzięki zastosowaniu ultrafioletu jako źródła światła, wywołuje fluorescencję niektórych substancji chemicznych obecnych w komórkach, ale przede wszystkim jest stosowany do wykrywania specjalnych barwników fluoryzujących (fluorochromów) wprowadzanych do komórek; zaletą tego mikroskopu jest jego czułość – dzięki wyraźnemu sygnałowi (świecenie) można zaobserwować nawet bardzo niewielkie ilości fluorochromu (ryc. 15.9), a także struktury o rozmiarach mniejszych niż zdolność rozdzielcza (jeżeli związany z nimi fluorochrom emituje wystarczającą ilość światła). Współczesne badawcze mikroskopy świetlne zawierają zazwyczaj wbudowane lub wymienne wyposażenie dla wszystkich powyżej przedstawionych odmian i w zależności od potrzeb można je używać, korzystając z tego samego mikroskopu. Standardowym wyposażeniem jest też cyfrowy aparat fotograficzny i komputer



Rycina 15.7 Badanie przepływu jonów techniką „łatkową" (wg B. Alberts).

z oprogramowaniem umożliwiającym zapisywanie obrazów, ich cyfrową obróbkę i analizę (zob. *Cyfrowe metody rejestracji i przekształcania obrazu mikroskopowego*).

Mikroskop konfokalny (współogniskowy) jest przyrządem o innych zasadach działania; źródłem światła są w nim lasery emitujące promieniowanie w odpowiednich zakresach widma. Promień lasera skanuje badany preparat, czyli z dużą szybkością przesuwa się wzdłuż równoległych linii, wzbudzając fluorescencję całej próbki. Układy optyczne kondensora i obiektywu mają wspólną ogniskową w płaszczyźnie preparatu, co oznacza, iż najmocniej jest oświetlana tylko jedna, bardzo cienka (0,1–1,0 μm) warstwa preparatu – ta, z której obiektyw formuje ostry obraz (ryc. 15.10). Jednocześnie obecność w układzie optycznym wąskiej przesłony pozwala na eliminację promieni pochodzących ze struktur położonych powyżej i poniżej tej warstwy. W sensie praktycznym oznacza to bardzo ostry ob-

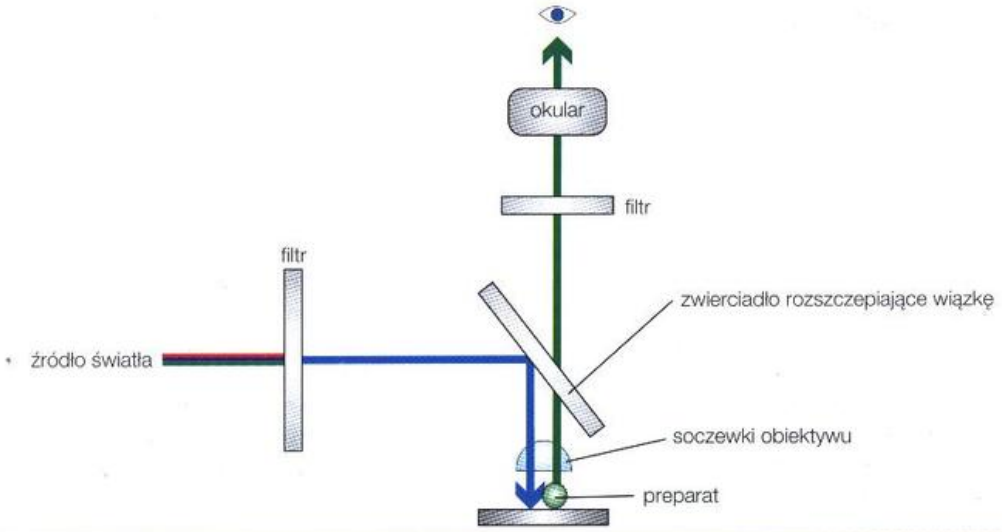


Rycina 15.8 Powstawanie obrazu w mikroskopie świetlnym (wg B. Alberts).

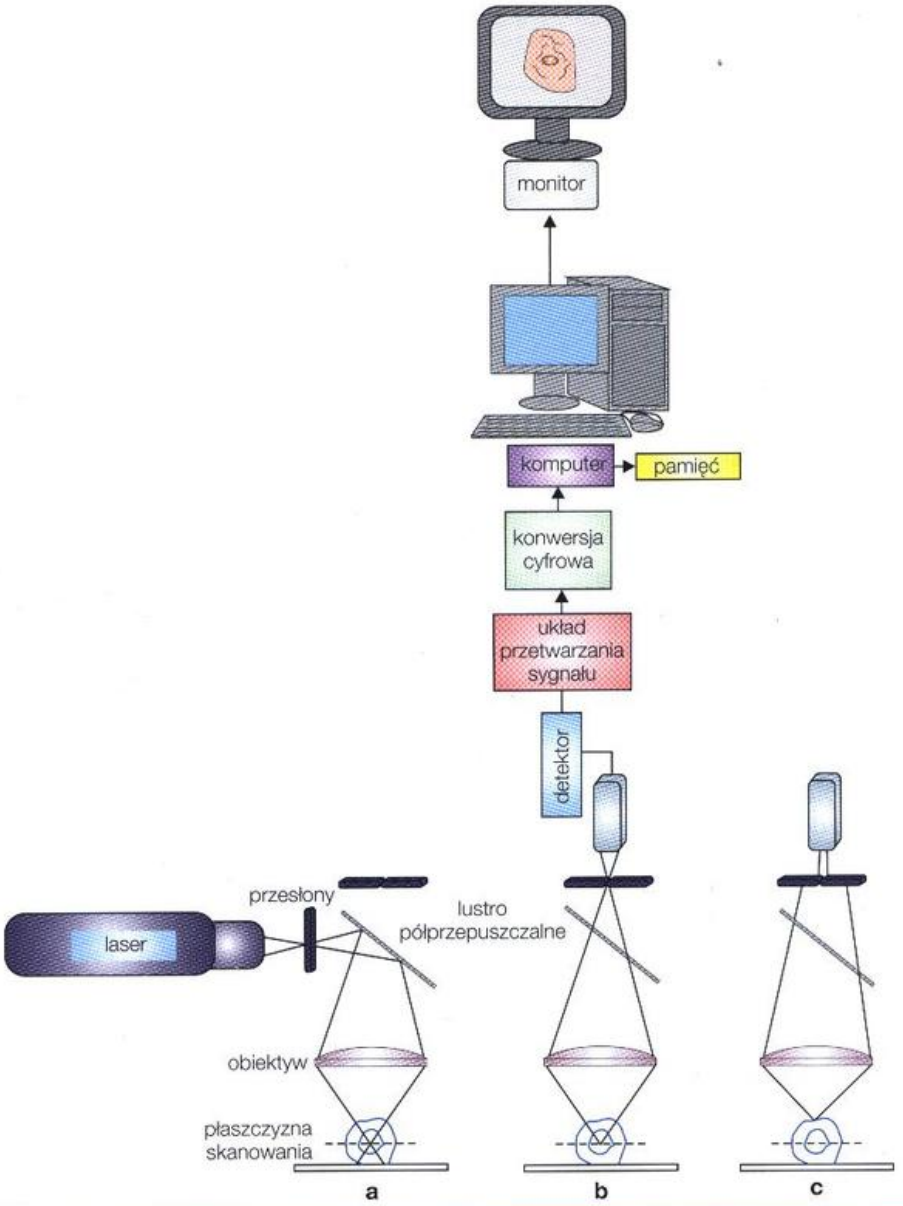
raz, znacznie wyraźniejszy od uzyskanego w klasycznym mikroskopie fluorescencyjnym. Obraz jest rejestrowany przez detektor, przekształcany w postać cyfrową, zapisywany i wyświetlany na monitorze. Zmieniając odległość obiektywu od preparatu, można przeglądać jego kolejne warstwy („przekroje optyczne"), a program komputerowy umożliwia przestrzenną rekonstrukcję preparatu przez nałożenie na siebie obrazów z różnych warstw.

Podobne możliwości stwarza **mikroskop dwufotonowy**, wykorzystujący tzw. efekt dwufotonowy: jeżeli cząsteczka fluorochromu jednocześnie (w czasie 10^{-8} s) pochłonie dwa fotony spójnego światła o niższej energii, np. podczerwieni, energie fotonów się sumują, wywołując fluorescencję. Prawdopodobieństwo takiego wydarzenia wzrasta, jeżeli gęstość fotonów przechodzących przez cząsteczkę fluorochromu będzie bardzo wysoka, czyli jeżeli preparat zawierający fluorochrom zostanie oświetlony mocno zogniskowanym światłem. W punkcie ogniska gęstość fotonów będzie wystarczająca do wywołania efektu dwufotonowego, natomiast poza tym punktem nigdy do niego nie dojdzie. W mikroskopie dwufotonowym źródłem światła jest laser, który wysyła intensywne pulsy podczerwieni, zogniskowane przez obiektyw w obrębie preparatu (ryc. 15.11), a równocześnie wiązka oświetlająca skanuje preparat. Z uwagi na to, iż ognisko wiązki ma małe rozmiary (poniżej 0,1 μm), światło widzialne jest emitowane wyłącznie z jednej, bardzo cienkiej warstwy preparatu i nie ma potrzeby eliminowania promieni pochodzących z innych warstw.

Uwidocznienie pojedynczych cząsteczek (np. białek) zlokalizowanych na powierzchni komórek umożliwia **mikroskop TIRF** (fluorescencji całkowitego wewnętrznego odbicia, ang. *total internal reflection fluorescence*). Wykorzystuje on tzw. falę zanikającą, powstającą po oświetleniu preparatu pod takim kątem, pod którym światło na granicy preparatu ulega całkowitemu odbiciu. Fala zanikająca ma bardzo mały zasięg (100–200 nm) i tylko z takiego obszaru emitowana jest fluorescencja.



Rycina 15.9 Schemat budowy mikroskopu fluorescencyjnego (wg B. Alberts).

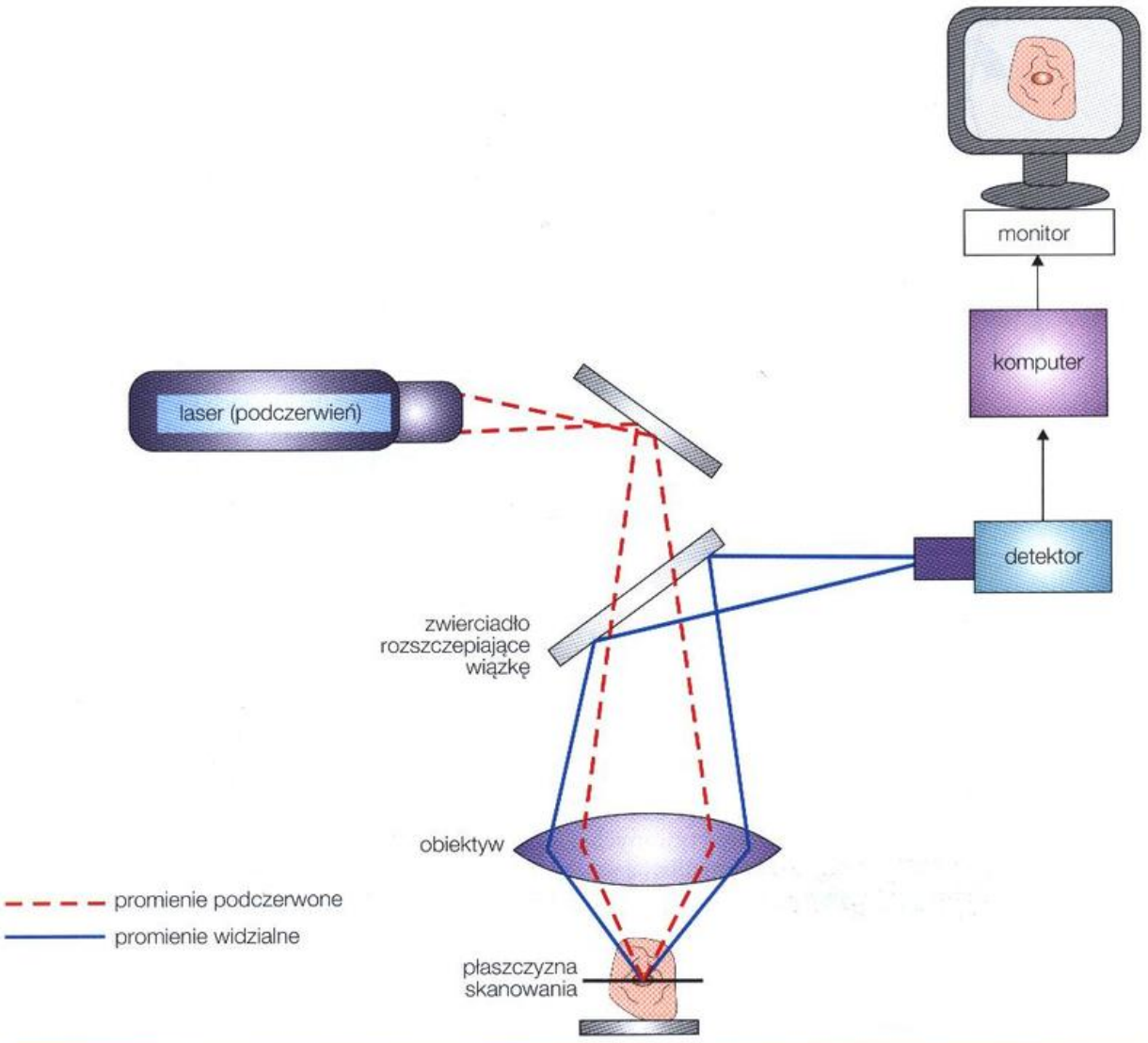


Rycina 15.10 Budowa mikroskopu konfokalnego: **a.** przebieg promieni oświetlających preparat, **b.** przebieg promieni tworzących obraz, **c.** promienie spoza płaszczyzny obrazu są w większości zatrzymywane przez przesłonę.

Mikroskopy elektronowe

Mikroskop elektronowy wykorzystuje do tworzenia obrazu strumień elektronów, mający charakter fali o bardzo niewielkiej długości. Dzięki temu zdolność rozdzielcza mikroskopów elektronowych wynosi – w zależności od typu mikroskopu – od 0,2 nm do 5 nm, co pozwala na uwidocznienie w obrazie mikroskopowym nie tylko nawet najmniejszych struktur wewnątrzkomórkowych, ale niekiedy nawet pojedynczych cząsteczek białkowych.

Ogólna konstrukcja układu tworzącego obraz w mikroskopie elektronowym jest zgodna z zasadami budowy układu optycznego mikroskopu świetlnego. Strumień elektronów jest wytwarzany w procesie termoemisji lub emisji polowej przez tzw. działo elektronowe (odpowiednik źródła światła), przyspieszany w silnym polu elektrycznym, a następnie uginany przez kolejne „soczewki" elektromagnetyczne: kondensor, obiektyw i projektor. Wszystkie te elementy, wraz z preparatem,

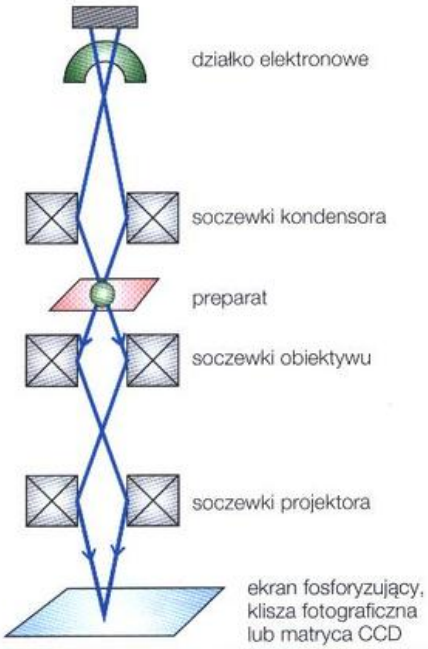


Rycina 15.11 Budowa mikroskopu dwufotonowego.

są umieszczone w kolumnie próżniowej, ponieważ tylko w warunkach wysokiej próżni można bez przeszkód wytworzyć i formować wiązkę elektronów. W badaniach komórek korzysta się z dwóch podstawowych typów mikroskopu elektronowego.

Transmisyjny mikroskop elektronowy działa na podobnej zasadzie jak mikroskop świetlny: strumień elektronów przechodzi przez preparat, w którym odpowiednio kontrastowane (związkami metali ciężkich) struktury w zróżnicowany sposób pochłaniają elektrony (ryc. 15.12). Wytworzony przez soczewki obraz jest rzutowany na ekran pokryty warstwą substancji fluoryzującej pod wpływem bombardowania elektronami – w ten sposób można zobaczyć monochromatyczny obraz utworzony przez ciemniejsze lub jaśniejsze kontury, a kamera wyposażona w światłoczułą lub wrażliwą na elektrony matrycę umożliwia jego rejestrację.

Skaningowy mikroskop elektronowy używany jest do badania powierzchni komórkowych; daje ich bardzo plastyczny, prawie trójwymiarowy obraz, choć o niższej rozdzielczości w porównaniu z mikroskopem transmisyjnym (ryc. 15.13). Bardzo wąski, skupiony przez kondensor i obiektyw strumień elektronów skanuje powierzchnię preparatu pokrytą warstewką metalu ciężkiego (złota, platyny). Elektrony odbijają się od tej powierzchni i są wychwytywane przez detektor umieszczony powyżej poziomu preparatu. W danym momencie liczba i kierunek biegu takich elektronów (a zatem



Rycina 15.12 Budowa transmisyjnego mikroskopu elektronowego (wg B. Alberts).

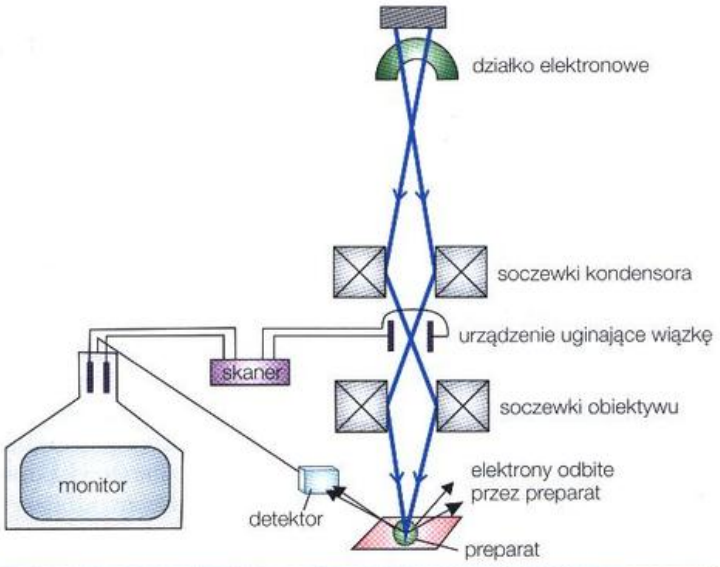
liczba elektronów trafiających do detektora) zależą od kąta nachylenia skanowanego fragmentu powierzchni w stosunku do padającej nań wiązki. Detektor przekształca energię wychwytywanych elektronów w impulsy elektryczne, umożliwiające wyświetlenie obrazu na monitorze i jego rejestrację.

Specjalne metody stosowane w mikroskopii elektronowej

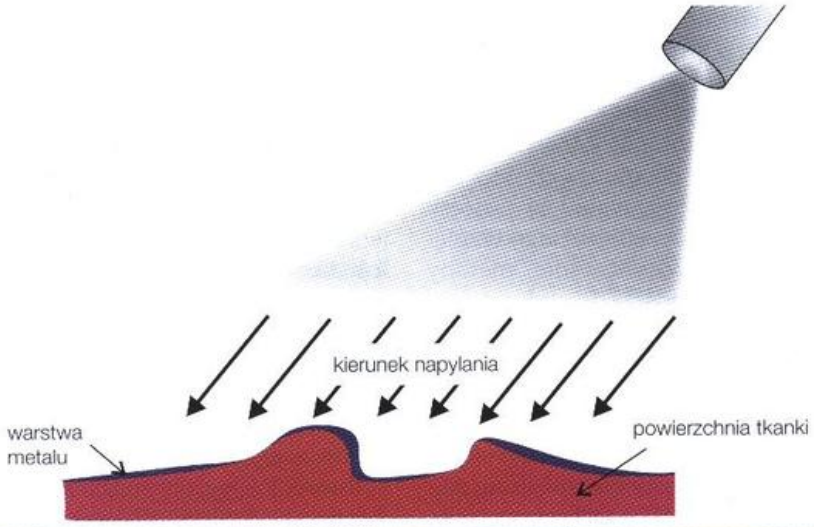
W strukturalnych badaniach komórek z użyciem transmisyjnego mikroskopu elektronowego stosuje się nie tylko rutynową procedurę kontrastowanych skrawków, ale również metody specjalnie dostosowane do możliwości oferowanych przez ten mikroskop. Wykorzystują one jego wysoką zdolność rozdzielczą, pozwalając na uwidocznienie tak drobnych zróżnicowań powierzchni preparatu, jakie nie są dostrzegalne w mikroskopie skaningowym.

W rozmazach wykonanych z zawiesin bardzo niewielkich struktur (białka i ich kompleksy, kwasy nukleinowe, wirusy, małe organelle) do zobrazowania ich kształtu jest użyteczne **barwienie negatywowe** (barwnik zatrzymujący elektrony nie wiąże się z tymi strukturami, lecz szczelnie wypełnia przestrzenie między nimi, przez co są one wyraźnie widoczne jako jasne twory na ciemnym tle).

Podobny efekt daje **cieniowanie**, czyli pokrycie powierzchni preparatu bardzo cienką (1–2 nm) warstewką metalu (platyną) napylanego pod pewnym kątem, co powoduje powstanie zróżnicowań jej grubości uzależnionych od kształtu pokrytych przez nią struktur (ryc. 15.14). Warstewka metalu jest wystarczająco cienka, aby część elektronów mogła przez nią przeniknąć, a zróżnicowania jej grubości powodują powstanie plastycznego obrazu badanych struktur. Taka warstewka oddzielona od powierzchni preparatu nosi nazwę **repliki**.



Rycina 15.13 Budowa skaningowego mikroskopu elektronowego (wg B. Alberts).

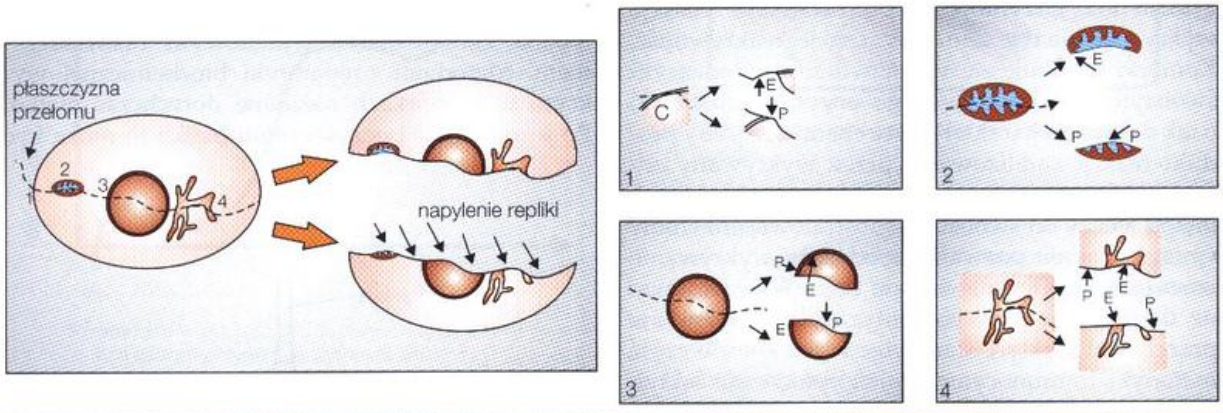


Rycina 15.14 Cieniowanie powierzchni preparatu metalem do badań w transmisyjnym mikroskopie elektronowym.

Metoda **mrożenia i łamania** (ang. *freeze-fracture*) jest używana głównie do badania błon biologicznych, gdyż umożliwia obserwację znacznych ich obszarów w płaszczyźnie błony (ryc. 15.15). Materiał zamraża się, następnie w warunkach próżniowych przełamuje, a z powierzchni przełomu sporządza się repliki. Komórki przełamują się wzdłuż płaszczyzn najmniejszego oporu, którymi są fosfolipidowe dwuwarstwy błon. Korzystając z tej metody, można zatem badać rozmieszczenie białek błonowych (widocznych jako wystające cząstki na tle gładkiej powierzchni lipidów) oraz strukturę ich kompleksów, np. połączeń międzykomórkowych. Odmianą tej techniki jest **mrożenie i głębokie rytowanie** (ang. *deep etching*), podczas którego materiał cieniuje się dopiero po kilku minutach od chwili jego przełamania. Pod wpływem próżni dochodzi wówczas do sublimacji wody z preparatu i odsłonięcia głębiej położonych struktur. Metoda ta jest szczególnie przydatna do badania przestrzennego układu elementów cytoszkieletu.

Cytochemia klasyczna i cytochemia enzymów

Rutynowe metody barwienia komórek w preparatach mikroskopowych straciły już przydatność w doświadczalnych badaniach komórki, gdyż nie



Rycina 15.15 Metoda mrożenia i łamania. Komórka zostaje przełamana na dwie części, powierzchnię przełomu jednej z nich poddaje się cieniowaniu metalem, a następnie przez usunięcie (wytrawienie) materiału biologicznego pozostawia samą warstewkę metalu (replikę), którą następnie ogląda się w transmisyjnym mikroskopie elektronowym. Obok przedstawiono przykłady płaszczyzn przełomu niektórych komórkowych struktur błoniastych: 1. błona komórkowa (zaznaczono jej trójwarstwową budowę), 2. mitochondrium, 3. otoczka jądrowa, 4. siateczka śródplazmatyczna; C – cytoplazma, E – płaszczyzna egzoplazmatyczna, P – płaszczyzna protoplazmatyczna. Linia przerywana wyznacza płaszczyznę przełomu.

dostarczają dokładnych informacji o charakterze chemicznym barwionych struktur. Używa się ich niekiedy tylko jako metod uzupełniających oraz w diagnostyce histopatologicznej. Kluczowym celem metod zastępujących barwienie jest wykrycie *in situ* konkretnych związków chemicznych, których rozmieszczenie pozwoliłoby na wgląd w procesy toczące się w komórce i jej otoczeniu. Z tego względu wszystkie stosowane współcześnie metody cechują się **swoistością** (zdolnością do wykrywania określonych substancji) – im jest ona wyższa, tym większą wartość ma zastosowana metoda.

Najstarszym i powoli wychodzącym już z użycia działem takich metod jest klasyczna cytochemia. Komórki lub skrawki tkanek umieszcza się roztworze zawierającym odpowiednio dobrane substraty dla reakcji cytochemicznej, czyli reakcji zachodzącej między nimi a wykrywanym w komórkach związkiem chemicznym. Wynikiem takiej reakcji jest barwny (lub gęsty elektronowo) oraz nierozpuszczalny (czyli niedyfundujący z miejsca powstania) produkt, którego lokalizacja wyznacza miejsce występowania wykrywanej substancji. Metody klasycznej cytochemii mają z reguły ograniczoną swoistość i pozwalają na wykrywanie raczej spokrewnionych grup związków chemicznych (obojętne i kwaśne cukrowce, lipidy, białka bogate w niektóre aminokwasy, kwasy nukleinowe), a nie ściśle określonych związków. Najbardziej popularne metody cytochemiczne to: reakcja PAS (wykrywająca obojętne wielocukrowce), reakcja Feulgena (wykrywająca DNA) oraz reakcja FIF (fluorescencja indukowana formaldehydem, wykrywa aminy biogenne).

Szczególnym działem klasycznej cytochemii jest **cytochemia enzymów**. Przeprowadzane reakcje wykrywają nie tyle sam enzym, co jego **aktywność**. Komórki inkubuje się w roztworze zawierającym swoisty(e) dla wykrywanego enzymu substrat(y) o tak dobranej charakterystyce chemicznej, aby produkt reakcji katalizowanej przez wykrywany enzym był barwny i nierozpuszczalny. Swoistość tych metod zależy od swoistości substratowej enzymów i zazwyczaj nie pozwala na odrębne wykrywanie izoenzymów. Obecnie są one najczęściej stosowane do wykrywania enzymatycznych znaczników przeciwciał i lektyn, stanowiąc w ten sposób część metodyki immunocytochemii i cytochemii lektyn (zob. niżej). W ograniczonym zakresie używa się ich również w diagnostyce histopatologicznej.

Immunocytochemia

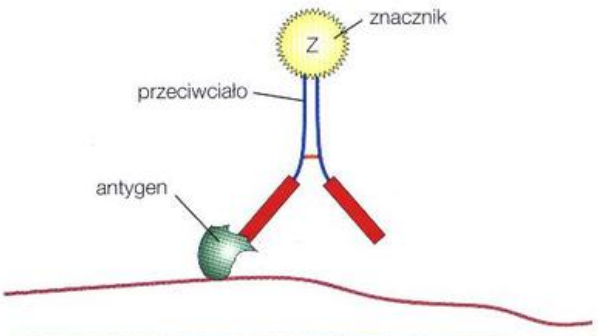
Metody immunocytochemiczne opierają się na bardzo wysokiej swoistości **wiązania antygenu z przeciwciałem**. Cząsteczka przeciwciała wiąże tylko konkretny antygen (jest nim zazwyczaj jakieś **białko**), a właściwie jego fragment (**epitop**) o ściśle określonej konfiguracji przestrzennej. Używając przeciwciał, można zatem wykrywać pojedyncze rodzaje białek występujących w komórkach i substancji międzykomórkowej (ryc. 15.16).

W reakcjach immunocytochemicznych komórki lub skrawki tkanek inkubuje się w roztworach zawierających przeciwciała skierowane przeciw wykrywanym antygenom. Miejsce związania przeciwciała wyznacza lokalizację antygenu. Aby to uwidocznić, przeciwciała są **znakowane**, czyli przyłącza się do nich substancje widoczne w obrazie mikroskopowym:

- **fluorochromy** emitujące fluorescencję o różnych barwach (immunofluorescencja),
- **enzymy** (peroksydaza, fosfataza zasadowa), których lokalizację uwidacznia się, przeprowadzając dodatkową reakcję cytoenzymatyczną,
- **metale ciężkie** (złoto koloidalne) widoczne w obrazie mikroskopu elektronowego w postaci wyraźnych ziarenek.

Przeciwciała przeciw określonym antygenom uzyskuje się przez immunizację zwierząt laboratoryjnych: podaje się zwierzęciu antygen, a po pewnym czasie albo izoluje przeciwciała z osocza (są to tzw. przeciwciała poliklonalne – o niższej swoistości, wiążące wiele epitopów), albo przeprowadza selektywną hodowlę komórek wytwarzających tylko jeden rodzaj przeciwciała, które izoluje się następnie z płynu hodowlanego (przeciwciała monoklonalne – o wyższej swoistości, wiążące pojedynczy epitop) (ryc. 15.17 i 15.18).

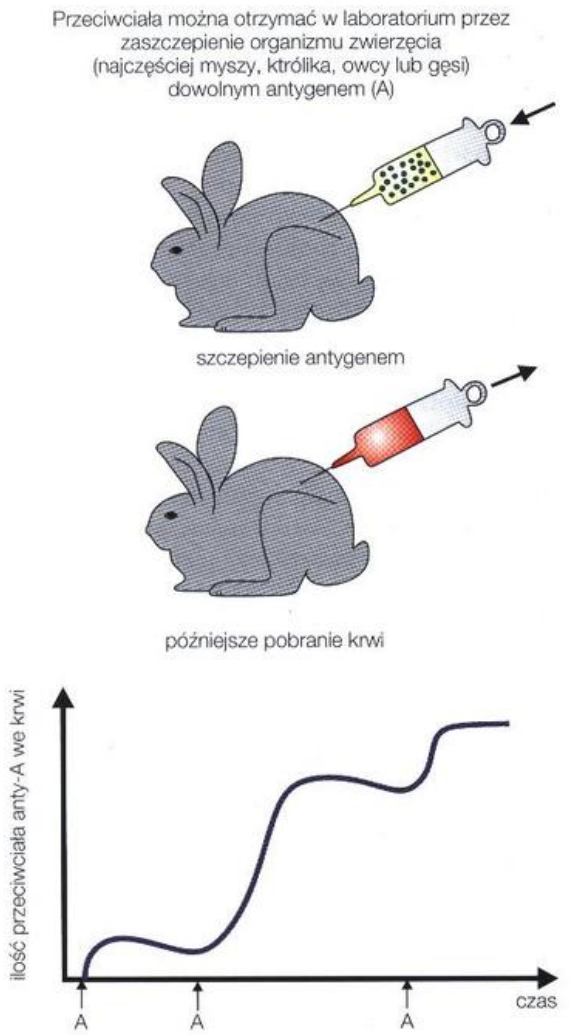
Zastosowanie metodyki immunocytochemicznej można zilustrować przykładowym doświadczeniem. Metodami preparatyki biochemicznej wykryto w komórkach nieznane dotychczas białko. Po jego izolacji i oczyszczeniu białko to może być



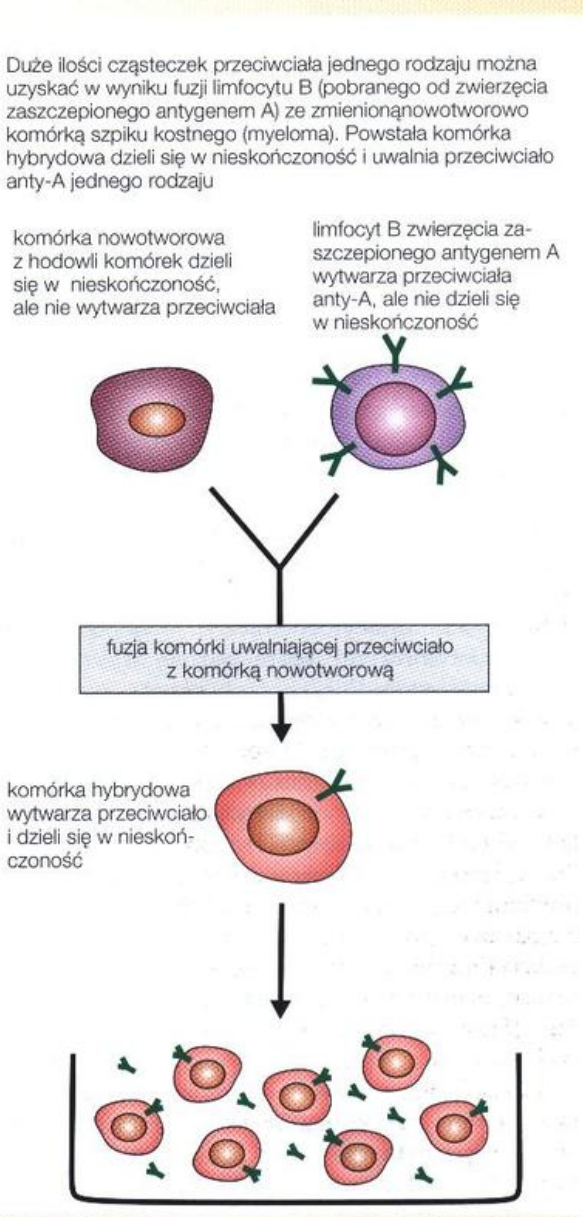
Rycina 15.16 Bezpośrednia reakcja immunocytochemiczna.

przedmiotem dalszych badań biochemicznych, a jednocześnie służyć do immunizacji i wytworzenia swoistych przeciwciał. Przeciwciała te, znakowane i użyte do reakcji immunocytochemicznej, pozwolą na określenie, w których komórkach i gdzie w obrębie komórki występuje to białko.

Firmy produkujące odczynniki do badań laboratoryjnych oferują przeciwciała przeciw ogromnej liczbie różnych antygenów, a także całe zestawy



Rycina 15.17 Otrzymywanie przeciwciał poliklonalnych (wg B. Alberts).



Rycina 15.18 Otrzymywanie przeciwciał monoklonalnych (wg B. Alberts).

do przeprowadzania reakcji immunocytochemicznych. Reakcje te są obecnie rutynowo stosowane w diagnostyce histopatologicznej.

Cytochemia lektyn

Lektyny to grupa glikoproteidów wyizolowanych z tkanek roślinnych i zwierzęcych. Mają zdolność swoistego wiązania się z określonymi **resztami cukrowcowymi** (glukozą, mannozą, galaktozą, kwasem sialowym itd.). Znakowane lektyny stosuje się do wykrywania grup cukrowcowych w komór-

kach na tych samych zasadach, na jakich używa się przeciwciał w reakcjach immunocytochemicznych.

Hybrydocytochemia

Metody hybrydocytochemiczne umożliwiają wykrycie w preparacie mikroskopowym **odcinka DNA** lub **RNA o określonej sekwencji nukleotydów**. Wykorzystują zjawisko hybrydyzacji kwasów nukleinowych, stąd metody te określa się także nazwą **hybrydyzacja *in situ***.

Wykrywany fragment kwasu nukleinowego musi mieć znaną sekwencję nukleotydów. Używając technik biologii molekularnej, można wówczas zsyntetyzować swoistą dla niego sondę – odcinek DNA lub RNA o komplementarnej sekwencji nukleotydów. Do badań mikroskopowych sondy znakuje się fluorochromami, znacznikami antygenowymi, które można następnie wykryć, stosując metody immunocytochemiczne, lub izotopami promieniotwórczymi, które później wykrywa się za pomocą autoradiografii (zob. niżej).

Materiał przeznaczony do reakcji hybrydocytochemicznej należy najpierw poddać działaniu podwyższonej temperatury, aby spowodować denaturację kwasów nukleinowych w komórkach (rozdzielenie podwójnych łańcuchów na pojedyncze). Następnie przeprowadza się właściwą hybrydyzację, inkubując komórki lub skrawki tkanek w roztworze sondy, która wiąże się z wykrywanym odcinkiem kwasu nukleinowego. Ostatnim etapem procedury jest uwidocznienie znacznika sondy. Najczęściej sondy są uwidaczniane za pomocą fluorochromów związanych z sondą albo bezpośrednio, albo wykorzystanych do immunocytochemicznego wykrycia znaczników antygenowych. Ten wariant hybrydocytochemii znany jest pod nazwą FISH (ang. *fluorescent in situ hybridization*).

Metody hybrydocytochemiczne umożliwiają wykrywanie konkretnych genów lub ich fragmentów oraz ich lokalizacji w określonych miejscach chromosomów, badanie ekspresji genów (wykrywanie swoistego mRNA), a także identyfikację obcych kwasów nukleinowych (np. wirusów) w komórkach. Wspólnie z technikami biologii molekularnej odgrywają istotną rolę w tworzeniu map genowych, diagnostyce chorób dziedzicznych i wirusowych lub badaniach nad genetycznym podłożem nowotworów.

Jeżeli ilość kwasu nukleinowego o poszukiwanej sekwencji jest zbyt mała, aby można go było wykryć za pomocą hybrydocytochemii, stosuje się **łańcuchową reakcję polimerazową *in situ*** (*in situ* PCR). Reakcja ta, adaptowana do technik mikroskopowych z repertuaru metod biologii molekularnej, prowadzi do wielokrotnego powielenia badanego odcinka kwasu nukleinowego, co wystarczająco wzmacnia sygnał uzyskany w wykonanej następowo reakcji hybrydocytochemicznej.

Znaczniki i wskaźniki wprowadzane do żywych komórek

Przedstawione powyżej techniki swoistego uwidaczniania struktur komórkowych i ich chemicznych składników w obrazie mikroskopowym dotyczą głównie komórek martwych (uśmierconych w procesie utrwalania i/lub pokrojonych na cienkie skrawki po uprzednim zamrożeniu czy zatopieniu). W ostatnim dwudziestoleciu opracowano wiele metod umożliwiających uwidocznienie (głównie fluorescencyjne) zarówno całych organelli, jak i określonych związków chemicznych w komórkach żyjących. Z ich pomocą można zatem obserwować pod mikroskopem przebieg różnych procesów wewnątrzkomórkowych w czasie rzeczywistym.

Istnieją znaczniki różnych organelli komórkowych (mitochondriów, siateczki śródplazmatycznej, aparatu Golgiego, lizosomów), znakujące je w swoisty sposób poprzez wiązanie się z charakterystycznymi dla danej organelli związkami chemicznymi lub uczestnictwo w toczących się w niej procesach metabolicznych.

Pewne substancje fluoryzujące oraz peroksydaza (uwidaczniana reakcją cytochemiczną) służą do wykrywania komunikacji międzykomórkowej, śledzenia procesów absorpcji, endocytozy i trawienia wewnątrzkomórkowego, a w przypadku komórek nerwowych do wyznaczania przebiegu ich wypustek i lokalizacji ciał komórkowych (znacznik po podaniu do obszaru zakończeń nerwowych jest transportowany przez cytoplazmę lub wzdłuż błony komórkowej włókna nerwowego i po pewnym czasie dociera do ciała komórki). Taka technika badawcza nosi nazwę śledzenia (ang. *tracing*).

Niektóre niskocząsteczkowe, fluoryzujące substancje wprowadzane do komórek zmieniają intensywność lub barwę fluorescencji w zależności od stężenia jonów albo wartości błonowego potencjału elektrycznego. Można więc za ich pomocą monitorować zachodzące w komórce zmiany stężenia jonów, pH czy potencjału błonowego, co umożliwia badanie przebiegu wielu procesów: przewodzenia bodźców, zjawisk skurczowych, endocytozy i trawienia wewnątrzkomórkowego, funkcjonowania kanałów jonowych oraz regulacji egzocytozy i wielu reakcji enzymatycznych.

Nie wszystkie znaczniki mają zdolność do przechodzenia przez błony komórkowe, niektóre dostają się do wnętrza komórki w procesie endocytozy albo muszą być do niej wprowadzane poprzez mikroiniekcje lub za pośrednictwem liposomów (sztucznych pęcherzyków łączących się z błoną komórkową).

Metoda FRET

FRET (ang. *fluorescence resonance energy transfer*), czyli rezonansowy transfer energii fluorescencji, to zjawisko polegające na przekazaniu energii emitowanej przez cząsteczkę jednego fluorochromu cząsteczce innego fluorochromu. Przekazanie to jest możliwe tylko wówczas, gdy obie cząsteczki znajdą się bardzo blisko siebie (w odległości < 10 nm).

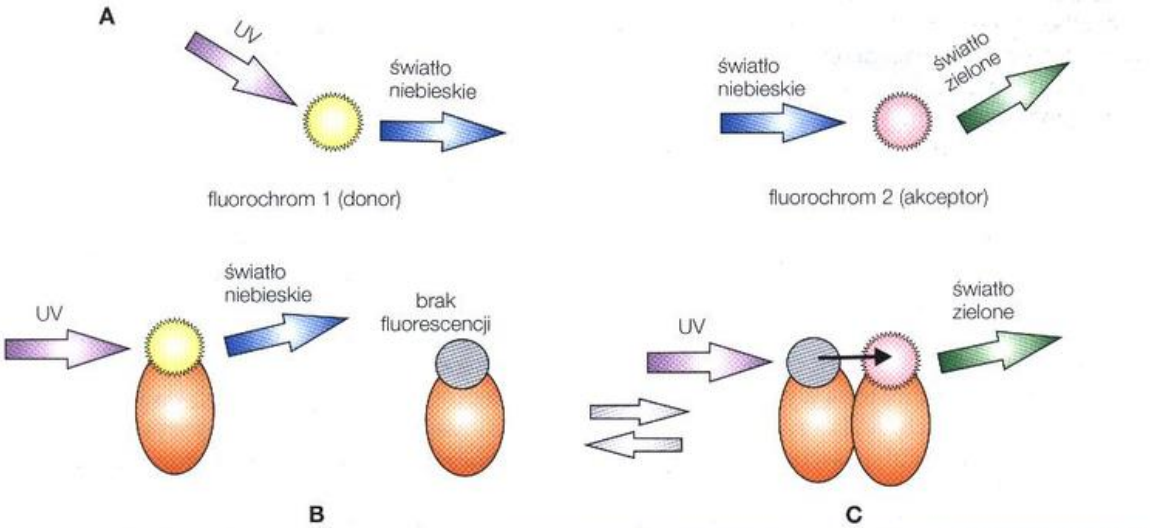
Metoda FRET polega na znakowaniu substancji wewnątrzkomórkowych dwoma różnymi fluorochromami dobranymi w ten sposób, że długość fali światła emitowanego przez pierwszy fluorochrom odpowiada długości fali wzbudzającej drugi fluorochrom. Przy ekspozycji tak znakowanych substancji na światło wzbudzające fluorescencję pierwszego fluorochromu (np. UV) będzie on emitował fluorescencję (np. niebieską) dopóty, dopóki nie dojdzie do jego kontaktu z drugim fluorochromem. Nastąpi wówczas transfer energii i emisja fluorescencji (np. zielonej) przez drugi fluorochrom, czyli zmiana barwy fluorescencji dostrzegana pod mikroskopem (ryc. 15.19).

Metoda ta pozwala na śledzenie interakcji pomiędzy pojedynczymi cząsteczkami związków chemicznych obecnych w komórce; umożliwia m. in. badanie zmian konformacyjnych (zwijania/rozwijania) białek, wiązania ligandów przez receptory, procesów polimeryzacji/depolimeryzacji substancji wysokocząsteczkowych i fuzji błon biologicznych.

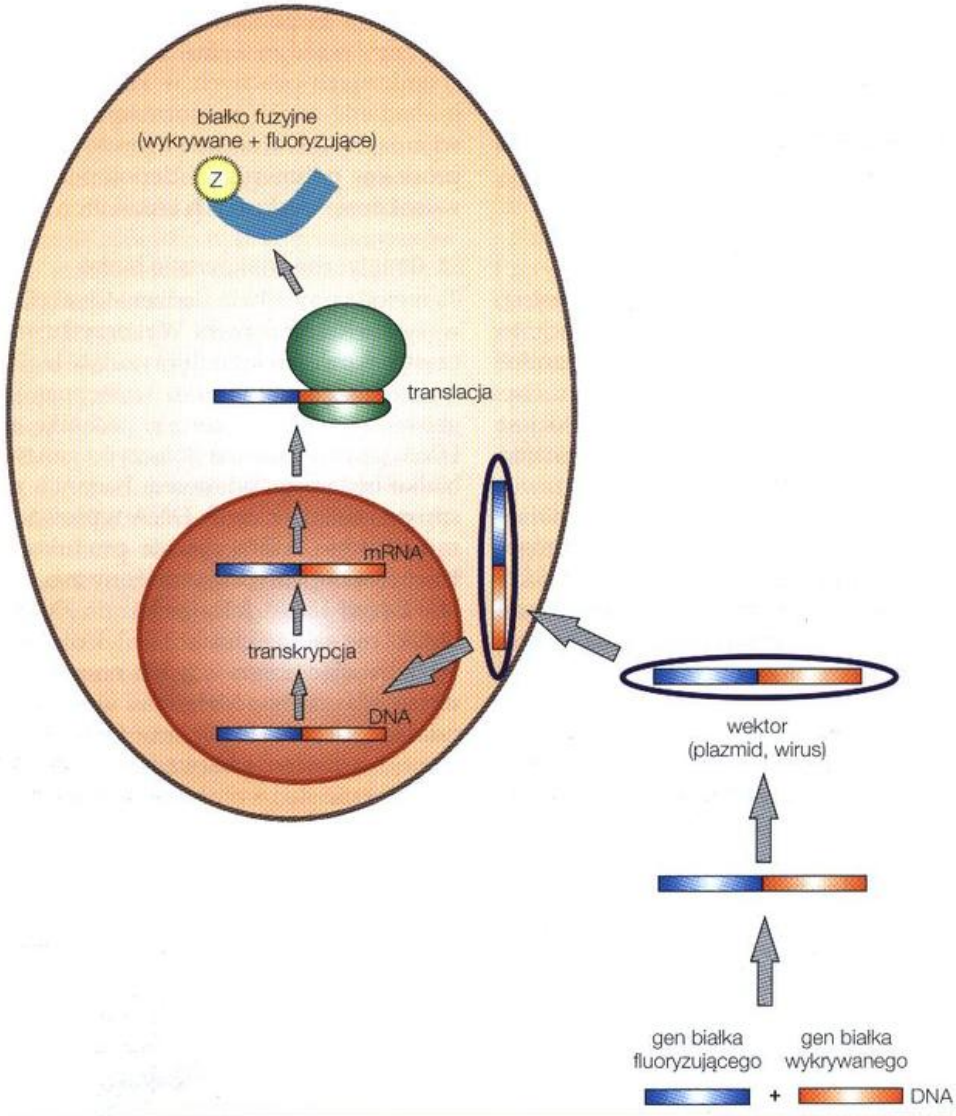
Genetyczne znakowanie białek

Ta metoda umożliwia śledzenie znakowanych białek w żywych komórkach. Wykorzystuje się tu niskocząsteczkowe, zielono fluoryzujące białko (ang. **GFP** – *green fluorescent protein*) występujące w pewnym gatunku meduzy. Stosując technikę rekombinacji DNA, gen GFP można połączyć z genem kodującym białko będące przedmiotem badań, a następnie tak spreparowany odcinek DNA wprowadzić do genomu komórki, która zacznie produkować hybrydę: łańcuch polipeptydowy złożony z badanego białka i GFP (ryc. 15.20). Jak się okazało, fluoryzujący „dodatek" nie zaburza funkcji białek nim znakowanych, umożliwiając obserwację ich normalnego zachowania się w komórce. Metodami inżynierii genetycznej udało się uzyskać odmiany GFP emitujące fluorescencję o różnych barwach – możliwe jest zatem jednoczesne śledzenie kilku różnych białek.

Znakowanie GFP jest wykorzystywane do badań procesów przepływu białek w komórce, sekrecji, przemieszczania się receptorów i cząsteczek sygnałowych, różnicowania komórek (przez znakowanie



Rycina 15.19 Metoda FRET. **A.** Przykładowa charakterystyka fluorochromów. **B.** Jeżeli cząsteczki znakowane fluorochromami nie stykają się ze sobą, światło emituje pierwszy fluorochrom. **C.** Przy kontakcie cząsteczek (i fluorochromów) następuje transfer energii z pierwszego do drugiego fluorochromu, który emituje światło o innej barwie.



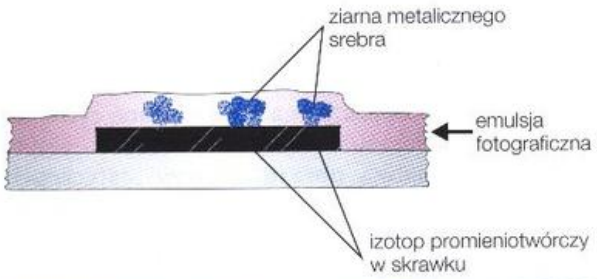
Rycina 15.20 Znakowanie białka wewnątrzkomórkowego białkiem fluoryzującym.

komórek macierzystych lub progenitorowych); gen GFP może także pełnić funkcję genu reporterowego (uwidaczniającego ekspresję innych, badanych genów).

Autoradiografia

Autoradiografia jest metodą **wykrywania izotopów promieniotwórczych**, wykorzystującą ich zdolność do **zaczerniania emulsji światłoczułych** (dawniej powszechnie stosowanych w klasycznej, analogowej fotografii). Wprowadzone do żywej komórki sztucznie wytworzone związki chemiczne zawierające izotopy zachowują się tak samo, jak związki naturalne (nieznakowane) i mogą uczestniczyć we wszystkich procesach metabolicznych. Stwarza to więc możliwość śledzenia dynamiki tych procesów i udziału w nich poszczególnych organelli i struktur subkomórkowych (ryc. 15.21).

Autoradiografia do celów mikroskopowych polega na pokryciu gotowego już preparatu mikroskopowego cienką warstwą emulsji światłoczułej. Promieniowanie (przede wszystkim beta) emitowane przez zawarty w preparacie izotop powoduje wytrącenie się nad miejscami, gdzie jest zlokalizowany, ziarenek metalicznego srebra, dobrze widocznych w mikroskopie zarówno świetlnym, jak i elektronowym i uwidaczniających lokalizację znakowanej izotopem substancji.



Rycina 15.21 Autoradiogram przygotowany do badań mikroskopowych.

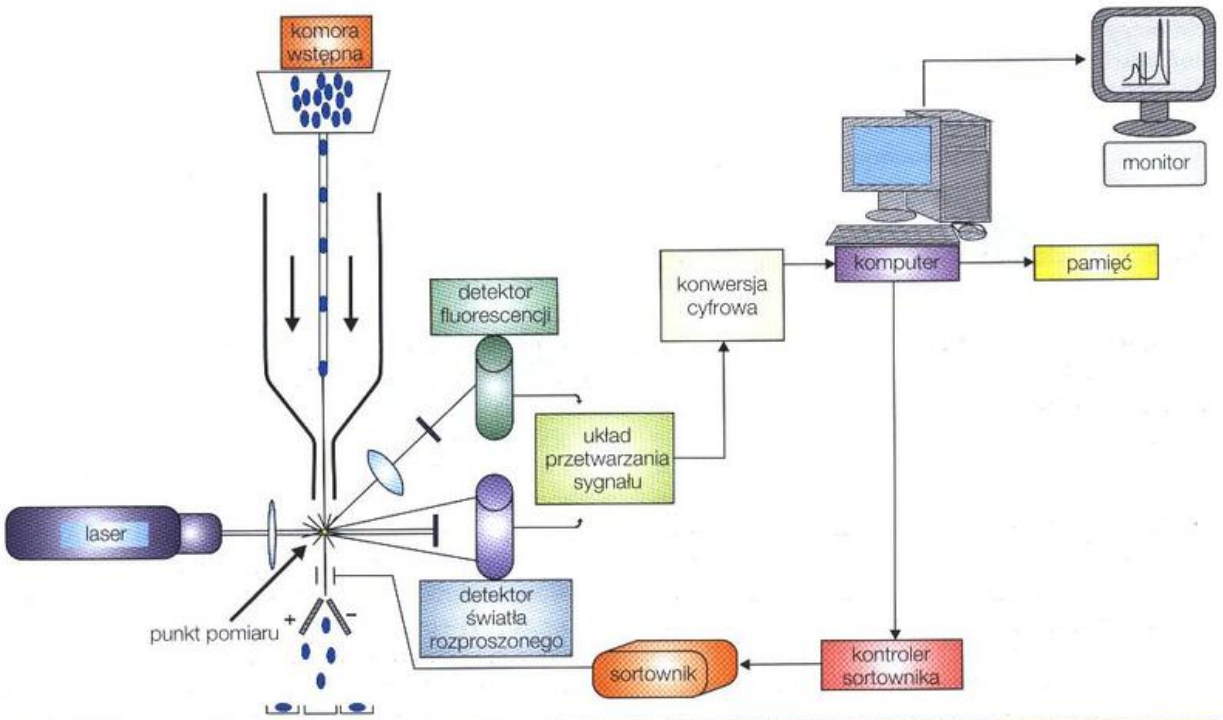
Wobec znacznego postępu metod badania żywych komórek, technik autoradiograficznych używa się obecnie przede wszystkim do wykrywania znakowanych izotopami sond w hybrydyzacji kwasów nukleinowych, a w procedurach biochemicznych do identyfikacji wyizolowanych białek i kwasów nukleinowych, znakowanych uprzednio izotopami.

Cytometria przepływowa

Jest to metoda ilościowej oceny właściwości fizycznych i chemicznych **komórek, które pojedynczo przepływają przez miejsce pomiaru**, przecinając wąski strumień światła. Strumień ten zostaje rozproszony w zależności od wielkości komórki, jej kształtu oraz właściwości optycznych cytoplazmy (zabarwienia, konsystencji), a także wywołuje świecenie fluorochromów, jeżeli komórki były nimi uprzednio znakowane. Do badań cytometrycznych używa się odpowiednio przygotowanych zawiesin komórkowych, a odczyty z każdego pomiaru są rejestrowane, zliczane i analizowane statystycznie przez komputer. Ze względu na znaczną liczbę komórek (ok. 10^4) mierzonych podczas jednego badania, wyniki takiej analizy są w pełni znamienne.

Cytometria nie należy wprawdzie do technik mikroskopowych, ale przygotowanie komórek do pomiarów cytometrycznych obejmuje metody cytochemiczne i immunocytochemiczne. Podobnie jak w badaniach mikroskopowych, od tego, w jaki sposób zostaną przygotowane komórki, zależy rodzaj uzyskanych informacji.

Urządzenie pomiarowe, cytometr przepływowy, umożliwia wytworzenie z zawiesiny komórek w płynie tak cienkiego strumienia, iż komórki przepływają w nim szeregowo (ryc. 15.22). Promień świetlny przecinający strumień jest emitowany przez laser, a efekty wywołane przez przepływające komórki są rejestrowane i mierzone przez kilka



Rycina 15.22 Budowa cytometru przepływowego wyposażonego w sortownik komórek.

odrębnych detektorów, które wysyłają zależne od odczytu impulsy elektryczne. Impulsy te są przekształcane w postać cyfrową i przetwarzane przez komputer wyposażony w odpowiednie oprogramowanie. Cytometr może być dodatkowo wyposażony w sortownik komórek, który rozdziela niejednorodne populacje komórek na trzy grupy różniące się własnościami (w zależności od wyniku pomiaru komórki uzyskują elektryczny ładunek: dodatni, ujemny lub zerowy, a następnie ich kierunek przepływu jest zmieniany przez silne pole elektryczne).

Za pomocą cytometrii przepływowej można badać m.in.: kształt i rozmiary komórek, ich żywotność, apoptozę, zawartość DNA, ploidię, obecność określonych genów, białek i cukrowców, przepuszczalność błon, aktywność receptorów, wewnątrzkomórkowe pH i stężenia jonów. W praktyce laboratoryjno-klinicznej cytometria służy m.in. do diagnostyki rozrostowych chorób krwi, zaburzeń układu immunologicznego, a także do oceny właściwości komórek nowotworowych, od których często zależy rokowanie i leczenie.

Cyfrowe metody rejestracji i przekształcania obrazu mikroskopowego

Rozwój technik cyfrowych wpłynął oczywiście również na metodykę stosowaną w badaniach komórek. Przekształcenie rejestrowanego przez detektor czy kamerę obrazu w postać cyfrową stwarza możliwość jego zapisywania i dalszego przetwarzania. Można w ten sposób optymalizować parametry obrazu: jasność, kontrastowość i ostrość, a także eliminować tło maskujące badane struktury, uzyskując więcej informacji w porównaniu z obrazem widzianym bezpośrednio w mikroskopie. Rejestracja obrazu w czasie rzeczywistym pozwala na badanie dynamicznych procesów zachodzących w żywych komórkach (ruch, transport wewnątrzkomórkowy, podziały komórkowe). Procesy te, rejestrowane przez kamerę zespoloną z mikroskopem świetlnym (**wideomikroskopia**), mogą być poddane cyfrowej optymalizacji obrazu.

Cyfrowa analiza obrazu dotyczy statycznych obrazów z mikroskopu świetlnego i elektronowego. Dzięki specjalistycznemu oprogramowaniu, obiekty znajdujące się na obrazie (struktury wewnątrzkomórkowe, całe komórki, ich zespoły, składniki substancji międzykomórkowej) można wyodrębnić z tła, a następnie wykonać pomiary ich wskaźników morfometrycznych (liczebność, pole, obwód, wymiary) i wyliczyć parametry pochodne (gęstość, współczynniki kształtu). Możliwe jest również przeprowadzenie trójwymiarowej rekonstrukcji badanych obiektów na podstawie wielu obrazów przedstawiających ich kolejne przekroje.

Piśmiennictwo

Drela N.: *Wykrywanie wewnątrzkomórkowych cytokin metodą cytometrii przepływowej – zastosowanie i problemy.* Post. Biol. Kom. 2001, 28, 129–146.

Drukała J.: *Kokultury komórkowe w rekonstrukcji skóry w zastosowaniu klinicznym.* Post. Biol. Kom. 2001, supl. 16, 28, 97.

Słomski R., Kwiatkowska J., Siemieniako B., Napierała D., Pławski A., Chlebowska H., Dziechciowska K., Słomska M.: *Zastosowanie analizy DNA w ustalaniu ojcostwa.* Post. Biol. Kom. 1998, supl. 10, 25, 137–156.

Słomski R., Napierała D., Kwiatkowska J.: *Reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR) w badaniach naukowych i diagnostyce molekularnej.* Post. Biol. Kom. 1998, supl. 10, 25, 195–217.

Słomski R., Siemieniako B., Kwiatkowska J., Napierała D.D.: *Diagnostyka molekularna.* Post. Biol. Kom. 1998, supl. 10, 25, 9–28.

HASŁA

Adresowanie białek

Procesy prowadzące do dostarczenia białek powstających w cytoplazmie do poszczególnych przedziałów komórkowych, dzięki istnieniu **sekwencji sygnałowych** i/lub **sortujących**.

Agonista (ang. *agonist*)

Ligand zdolny do swoistego wiązania receptora i jego aktywacji, prowadzącej do przekazania i przetwarzania informacji przez komórkę oraz wywołania specyficznej reakcji komórki.

Akrecja

Zwiększenie rozmiarów i masy tkanki wywołane wzrostem masy substancji międzykomórkowej.

Analiza i modyfikacja genów. Inżynieria genetyczna

Poznanie mechanizmów regulujących funkcję genów umożliwiło opracowanie metod analizy kwasów nukleinowych oraz ich enzymatycznej syntezy i modyfikacji. Wiedza o mechanizmach przekazywania informacji genetycznej drobnoustrojów pozwoliła na rozpowszechnienie technik klonowania genów. Współczesna inżynieria genetyczna umożliwia nie tylko modyfikację poszczególnych genów, wprowadzanie ich do drobnoustrojów, nadprodukcję białek w układach heterologicznych, ale także powstawanie zwierząt transgenicznych, mających nowe geny i pozbawionych określonych genów (myszy *knockout*).

Angiogeneza

Proces tworzenia nowych naczyń krwionośnych z już istniejących, zachodzący zarówno w okresie rozwoju embrionalnego, jak i w organizmach dojrzałych. Zjawisko to rzadko jest obserwowane w stanach fizjologicznych (regeneracja endometrium w cyklu miesiączkowym), natomiast często występuje w stanach patologicznych (gojenie ran, niedokrwienie, zapalenie, nowotwory). W angiogenezie kluczową rolę odgrywają VEGF, czynnik wzrostu fibroblastów (bFGF, *basic fibroblast growth factor*) oraz metaloproteinazy (MMP).

Anoikis

Apoptoza wywołana przez utratę połączenia komórek z substancją międzykomórkową i/lub innymi komórkami. Zależy od uwolnienia białka Bim z podrodziny białek BH3. Bim jest utrzymywane w nieaktywnej formie poprzez powiązanie z elementami cytoszkieletu. Po uwolnieniu Bim aktywuje białka Bax i Bak, prowadząc do aktywacji wewnątrzpochodnego szlaku apoptozy.

Antagonista (ang. *antagonist*)

Ligand zdolny do swoistego wiązania receptora, pozbawiony jednak właściwości do jego aktywacji. Antagonista swoiście konkuruje z agonistą

o miejsce wiązania na receptorze i blokuje jego wiązanie, co powoduje zablokowanie funkcji receptora. W wyniku działania antagonisty nie dochodzi do wywołania reakcji komórki lub określona reakcja zostaje zahamowana.

Antygen

Substancja charakteryzująca się antygenowością i immunogennością. Antygenowość to zdolność substancji do swoistego wiązania się z immunoglobulinami lub receptorami limfocytów T lub B, co powinno skutkować wywołaniem specyficznej odpowiedzi immunologicznej (immunogenność). Specyficzna część antygenu, która decyduje o jego swoistym wiązaniu do przeciwciała lub receptora na limfocycie, nosi nazwę **epitopu** lub **determinanty antygenowej**.

Aplazja

Brak narządu/tkanki lub części ciała spowodowany zaburzeniem rozwojowym.

Apoptosom

Olbrzymi (~1,4 MDa) kolisty heptamer powstający w cytozolu z białka APAF1, ulegającego oligomeryzacji pod wpływem uwolnionego z mitochondriów cytochromu c. Apoptosom rekrutuje cząsteczki prokaspazy 9, doprowadzając do ich autokatalitycznej aktywacji, charakterystycznej dla szlaku wewnątrzpochodnego inicjacji apoptozy.

Apoptoza

Proces programowanej śmierci komórek, charakteryzujący się aktywacją szeregu specyficznych szlaków biochemicznych. Wyróżnia się fazę **inicjacji** i fazę **egzekucji** apoptozy. Inicjacja może przebiegać poprzez szlak wewnątrzpochodny lub zewnątrzpochodny, prowadząc ostatecznie do aktywacji kaspaz inicjatorowych, które z kolei aktywują kaspazy egzekutorowe, odpowiedzialne za fazę egzekucji.

Asymetryczne podziały komórkowe

Podziały mitotyczne, w wyniku których zawarte determinanty w cytoplazmie komórki dzielącej się zostają nierównomiernie rozdzielone do komórek potomnych.

ATP jako uniwersalny przenośnik energii swobodnej w komórce

ATP jest cząsteczką bogatą w energię, ponieważ dwie z jej trzech grup fosforanowych są połączone wysokoenergetycznym wiązaniem fosfobezwodnikowym. Korzystna energetycznie reakcja hydrolizy końcowej grupy fosforanowej prowadzi do powstania ADP i P_i, przy czym odłączona grupa fosforanowa z łatwością zostaje przenoszona na inną cząsteczkę i energizuje ją. Dzięki temu ATP pośredniczy między reakcjami uwalniającymi energię a reakcjami wymagającymi energii.

Atrofia

Stopniowy zanik tkanki/narządu spowodowany najczęściej długotrwałym niedoborem substancji odżywczych.

Badanie *in situ* (w miejscu)

Badanie komórek lub ich składników w naturalnej lokalizacji i mikrośrodowisku, najczęściej na preparatach mikroskopowych.

Białka adaptorowe (ang. *adaptor proteins*)

Białka niemające własnej aktywności enzymatycznej, wiążące się do cytoplazmatycznych domen receptorów i pośredniczące w przeniesieniu sygnału od receptorów. Białka adaptorowe są najczęściej rodzajem łącznika między niektórymi receptorami (np. receptorami dla niektórych cytokin i receptorami komórek układu immunologicznego) a systemami enzymatycznymi komórki.

Białka Bcl-2

Heterogenna grupa białek regulująca wewnątrzpochodny szlak apoptozy. **Bcl-2** i **Bcl-X_L** są białkami zapobiegającymi apoptozie. Charakteryzują się one czterema domenami homologii Bcl2 (BH1234). Proapoptotyczne białka z tej grupy można podzielić na białka posiadające trzy domeny BH (**białka**

BH123) oraz białka posiadające tylko domenę **BH3**. Głównymi białkami BH123 są **Bax** i **Bak**, podczas gdy do białek BH3 zalicza się **Bid, Bim, Bad** oraz **Puma**. Białka Bcl-2 mogą występować w cytoplazmie, jednak większość z nich jest białkami wbudowanymi w zewnętrzną błonę mitochondrialną i/lub błonę siateczki śródplazmatycznej.

Białka błonowe

Transport wielu substancji przez dwuwarstwę lipidową może odbywać się dzięki wbudowanym w nią białkom. Wyróżnia się białka integralne przenikające przez dwuwarstwę domeną zbudowaną z około 20 aminokwasów, przyjmującą strukturę α-helisy, oraz białka związane z powierzchnią błony – białka powierzchniowe. Białka integralne są wbudowywane do błony w procesie kotranslacji albo przez fałdowanie łańcucha polipeptydowego. Specjalną formą wiązania z warstwą E błony charakteryzują się białka GPI zakotwiczone w błonie poprzez resztę związanego kowalencyjnie z białkiem glikozylofosfatydyloinozytolu, a także występujące w warstwie P białka acylowane kwasami tłuszczowymi oraz białka prenylowane.

Białka błony komórkowej erytrocytu

Są to glikoforyna i białko 3 szczytu elektroforetycznego. Te są powiązane z białkami powierzchniowymi i białkami szkieletu błony, co nadaje całej strukturze stabilność i dobre właściwości mechaniczne.

Białka G (ang. *G proteins*)

Rodzina małych białek mających zdolność do wiązania i hydrolizy GTP. Białka G są aktywatorami wielu przemian komórkowych, w tym aktywatorami wielu enzymów i elementów cytoszkieletu oraz uczestniczą w transporcie wewnątrzkomórkowym. Tak zwane heterotrimeryczne białka G, zbudowane z podjednostek α (właściwe białko G), β i γ, są czynnikami przenoszącymi sygnał od receptorów dla hormonów i neuropeptydów i aktywującymi enzymy syntetyzujące informatory wtórne. Innym przykładem białek G związanych bezpośrednio z przekazywaniem sygnałów przez receptory są białka RAS inicjujące szlak kinaz MAP, główny szlak aktywujący przemiany związane z cyklem komórkowym.

Białka motoryczne

Białka, które dzięki zdolności do hydrolizy ATP mogą aktywnie poruszać się wzdłuż mikrotubul i filamentów aktynowych. Białka motoryczne związane z mikrotubulami (**dyneina, kinezyna**) są zaangażowane w ukierunkowany transport organelli komórkowych, ruch chromosomów w czasie podziału komórki oraz ruch rzęsek i witek. Grupę białek motorycznych wiążących aktynę tworzą miozyny. Miozyna I umożliwia transport organelli wzdłuż filamentów aktynowych, podczas gdy miozyna II wchodzi w skład aparatu kurczliwego mięśni. W mięśniach poprzecznie prążkowanych miozyna II tworzy miofilamenty grube wsuwające się między miofilamenty cienkie, co prowadzi do skurczu mięśnia. Miozyna II umożliwia również przemieszczanie się komórek niemięśniowych oraz bierze udział w cytokinezie.

Białka opiekuńcze (ang. *chaperones*)

Stabilne białka mające powinowactwo do hydrofobowych sekwencji innych białek, łączące się z nowo powstałymi lub nieprawidłowo sfałdowanymi białkami. Oddziaływanie białek opiekuńczych zapobiega agregacji białek, warunkując ich prawidłowe fałdowanie z udziałem energii pochodzącej z hydrolizy ATP.

Białka osadnicze (rezydentne)

Białka specyficzne dla każdego przedziału, mające charakterystyczne sekwencje sortujące lub łączące się ściśle z innymi białkami osadniczymi, posiadającymi takie sekwencje.

Białka ostrej fazy

Białka osocza krwi powstają podczas zakażenia lub uszkodzenia tkanki. Głównym białkiem ostrej fazy jest białko C-reaktywne, które wiąże się z polisacharydami otoczek bakteryjnych, ułatwiając m.in. fagocytozę mikroorganizmów przez komórki żerne.

Białka płaszcza

Białka, takie jak **klatryna** czy **koatomery**, umożliwiające powstawanie pęcherzyków transportowych poprzez odkształcanie błon.

Białka wiążące aktynę (ABP)

Duża grupa białek wiążąca się z aktyną monomeryczną (aktyną G) bądź spolimeryzowaną (aktyna F, mikrofilamenty). ABP umożliwiają tworzenie pęczków i sieci mikrofilamentów, wpływają na ich stabilizację oraz przyczepienie się do organelli i błony komórkowej. Najważniejsze ABP to α-aktynina i miozyna.

Blotting (odciskanie)

Metoda identyfikacji rozdzielonych w procesie elektroforezy białek i kwasów nukleinowych. *Southern blotting* wykrywa DNA (znakowanie jak w hybrydocytochemii); *Northern blotting* wykrywa RNA (znakowanie jak w hybrydocytochemii); *Western blotting* wykrywa białka (znakowanie jak w immunocytochemii).

Błona komórkowa

Oddziela środowisko wewnętrzne komórki od otoczenia i reguluje oddziaływania ze środowiskiem i innymi komórkami. U eukariota wnętrze komórki jest dodatkowo podzielone błonami śródkomórkowymi na mniejsze przedziały umożliwiające jednoczesne prowadzenie reakcji biosyntezy (retikulum endoplazmatyczne, aparat Golgiego) i hydrolizy (endosomy, lizosomy), a także na gromadzenie tam jonów i określonych substancji.

Brak obrony immunologicznej przeciw nowotworowi, tolerancja immunologiczna

Komórki nowotworu wymykają się spod kontroli układu immunologicznego. Zwykle nie zdajemy sobie sprawy z tego, że choroba nowotworowa może rozwijać się **tylko** wtedy, gdy funkcjonowanie układu odpornościowego zostaje zaburzone. Choroba nowotworowa jest więc podwójną chorobą, która dotyczy pojawienia się komórek nowotworowych oraz wywołanych przez nie zaburzeń funkcji układu obronnego. Komórki nowotworowe mogą mieć niesprawny układ przygotowania antygenów w proteasomach lub mogą utracić zdolność do prezentacji antygenu z powodu niskiej ekspresji MHC I klasy. Nowotwór może ponadto zyskać zdolność do wytwarzania czynników immunosupresyjnych. Przyczynia się to do zjawiska tolerancji, gdy układ immunologiczny nie odpowiada bądź odpowiedź na pojawiające się komórki nowotworowe jest niewystarczająca.

Choroby proliferacyjne

Należą do nich choroby nowotworowe i sercowo-naczyniowe. Komórki nowotworowe mają łatwość przekraczania punktów kontrolnych fazy G1, S, G2 i M, ponieważ ich protoonkogeny przekształcają się w onkogeny na skutek mutacji lub translokacji chromosomowej. Łatwość przekraczania punktów kontrolnych może być także skutkiem zablokowania genów supresorowych. Miażdżyca naczyń ma swoją przyczynę w nadmiernej proliferacji miocytów gładkich. Urazy śródbłonka prowadzą do powstawania przyściennych agregatów płytek krwi wydzielających cytokiny PDGF i in. Cytokiny pobudzają proliferację miocytów gładkich i powstawanie guzków w błonie wewnętrznej naczyń, które następnie degenerują się i wapnieją, powodując powstawanie pierwotnych płytek miażdżycowych.

Chromatyna i chromosomy

DNA obecne w jądrze znajduje się w chromosomach, dwuniciowych cząsteczkach DNA połączonych z białkami. Chromatyna jest wysoko uporządkowanym kompleksem DNA i białek. Podlega zmianom polegającym na kondensacji i dekondensacji w czasie cyklu życiowego komórki, co wpływa na wydajność transkrypcji informacji genetycznej zawartej w DNA.

Ciałka apoptotyczne

Pozostałości po apoptotycznej komórce, otoczone błoną komórkową fragmenty cytoplazmy zawierające funkcjonalne organelle i skondensowane resztki chromatyny. Ulegają fagocytozie przez sąsiadujące komórki, bez wywoływania odczynu zapalnego.

Cykl komórkowy (cykl mitotyczny, cykl podziałowy)

Jest to szereg kolejno zachodzących zmian chemicznych, fizycznych i strukturalnych komórek.

Zmiany te prowadzą do podwojenia materiału genetycznego i epigenetycznego, a następnie do ich precyzyjnego rozdzielenia między potomne komórki. Składa się z **interfazy**, czyli fazy G1 + S + G2, oraz **mitozy**, czyli fazy M. Odpowiada za pomnażanie liczby komórek, czyli proliferację komórkową.

Cytochemia

Barwienie *in situ* konkretnych związków i substancji chemicznych, których rozmieszczenie pozwala na wgląd w procesy toczące się w komórce i jej otoczeniu.

Cytokiny

Rozpuszczalne mediatory reakcji immunologicznych, umożliwiają wzajemne komunikowanie się, oddziaływanie i kooperację między komórkami układu immunologicznego. **IFN** (interferony) – glikoproteiny wyspecjalizowane w hamowaniu replikacji wirusa. **IL** (interleukiny) – ukierunkowują komórki układu immunologicznego do proliferacji, dojrzewania i różnicowania. **Limfokiny** – cytokiny syntetyzowane przez limfocyty. **Monokiny** – cytokiny syntetyzowane przez makrofagi.

Cytometria przepływowa

Metoda ilościowej oceny właściwości fizycznych i chemicznych komórek, które pojedynczo przepływają przez miejsce pomiaru. Do badań używa się odpowiednio znakowane zawiesiny komórkowe, np. limfocyty znakowane przeciwciałami.

Cytoszkielet

Zespół wewnątrzkomórkowych włókienek białkowych, decydujący o kształcie komórki i jej wewnętrznej organizacji, jest zaangażowany w transport i rozmieszczenie organelli komórkowych oraz ruch i skurcz komórki. Do cytoszkieletu zalicza się: mikrotubule, mikrofilamenty i filamenty pośrednie.

Cząsteczki adhezyjne (CAM)

Grupa cząsteczek błon komórkowych odpowiedzialnych za adhezję i połączenia między komórkami lub z cząsteczkami substancji międzykomórkowej (ECM). Do CAM zalicza się: selektyny, kadheryny, integryny, IgCAM i inne. Część z nich tworzy struktury zwane połączeniami międzykomórkowymi.

Cząsteczki CD (ang. *cluster of differentiation*)

Antygeny zlokalizowane na powierzchni komórek umożliwiające ich różnicowanie. Mogą być zarówno receptorami, jak i ligandami i dzięki temu uczestniczyć w procesach komórkowych (np. przekazywanie sygnałów, adhezja). Dzięki antygenom CD można rozpoznać i sklasyfikować różne typy komórek pełniących w organizmie wielorakie funkcje (np. komórki układu immunologicznego – limfocyty).

Cząsteczki substancji międzykomórkowej (cząsteczki ECM)

Duża grupa białek i wielocukrów, które odgrywają ważną rolę w umiejscowieniu komórek. Część z nich tworzy błony podstawne. Cząsteczki ECM mają domeny łączące je między sobą lub z komórkami, co umożliwia tworzenie tkanek i narządów. Do cząsteczek ECM należą przede wszystkim: GAG, proteoglikany, kolagen, fibronektyna i laminina.

Czynniki transkrypcyjne

Białka, których obecność jest niezbędna do rozpoczęcia i regulacji przebiegu transkrypcji w komórkach eukariotycznych.

Czynniki transkrypcyjne (ang. *transcription factors*)

Czynniki białkowe wiążące się do swoistych sekwencji DNA w odcinkach regulatorowych (promotorach) genów i modulujące proces transkrypcji genu (syntezy swoistego RNA). Aktywacja swoistych czynników transkrypcyjnych jest warunkiem wystąpienia reakcji komórki na określoną informację odebraną przez receptor, szczególnie jeżeli reakcja ta wymaga pojawienia się nowych białek, wcześniej w komórce nieobecnych. W przypadku ligandów, takich jak: hormony steroidowe, hormo-

ny tarczycy, witaminy rozpuszczalne w tłuszczach lub niektóre pochodne lipidów, ich receptory są jednocześnie czynnikami transkrypcyjnymi (receptory jądrowe).

Defenzyny

Białka kationowe o silnym działaniu przeciwbakteryjnym i przeciwgrzybicznym.

Definicje starzenia

Ze statystycznego punktu widzenia starzenie jest zwiększeniem prawdopodobieństwa śmierci w miarę upływu czasu życia komórki czy organizmu. Z ewolucyjnego punktu widzenia starzenie jest zjawiskiem paradoksalnym, sprzecznym z prawem doboru naturalnego. Biologiczna definicja starzenia zawiera wiele elementów – przyczyn prowadzących do starzenia:

- istnienie genetycznego programu starzenia, niestabilności genomu i roli telomerów,
- uszkodzenia makrocząsteczek proteomu, genomu, epigenomu i lipidomu, przekładające się na zmiany struktury i funkcji tkanek.

Te elementy – przyczyny starzenia – spina razem **teoria zapalenia starczego.**

Degradacja zależna od siateczki śródplazmatycznej (ERAD, ang. *endoplasmic reticulum associated degradation*)

Degradacja nieprawidłowo sfałdowanych białek siateczki śródplazmatycznej, wymagająca retrotranslokacji tych białek przez kanał translokonu do cytoplazmy, gdzie zostają one ubikwitynowane i następnie degradowane przez proteasomy 26S.

Determinanty cytoplazmatyczne

Zlokalizowane w cytoplazmie makromolekuły (mRNA, białka), których obecność wpływa na kierunek różnicowania komórek. Mogą podlegać asymetrycznej dystrybucji w czasie podziałów komórkowych, co przyczynia się do zróżnicowania komórek potomnych. Determinanty cytoplazmatyczne zlokalizowane w cytoplazmie komórki jajowej (ooplazmie) i asymetrycznie rozmieszczane do powstających w czasie bruzdkowania blastomerów noszą nazwę determinantów ooplazmatycznych.

Dojrzewanie komórek

Proces o charakterze ilościowym zachodzący od chwili ustalenia wzoru aktywności genetycznej komórki do czasu uzyskania właściwego fenotypu komórkowego. Dojrzewanie może polegać na stopniowym gromadzeniu charakterystycznych substancji i struktur komórkowych oraz osiągnięciu odpowiednich rozmiarów i kształtu.

Dopełniacz (ang. *complement*)

Nieaktywne białka (proenzymy) osocza krwi uczestniczące w humoralnych reakcjach obronnych organizmu. Ich biologiczne właściwości ujawniają się po aktywacji (droga klasyczna i alternatywna). **Klasyczna droga aktywacji dopełniacza** to aktywacja dopełniacza przez kompleks antygen-przeciwciało. **Alternatywna droga aktywacji dopełniacza** – aktywacja dopełniacza przez np. polisacharydy otoczki bakteryjnej, endotoksyny. Rozpoczyna się od składnika C3 z pominięciem składników C1, C2, C4. **Droga lektynowa aktywacji dopełniacza** – inicjowana jest przez białko wiążące mannozę.

Dwuwarstwa lipidowa

Dwuwarstwa lipidowa zbudowana jest z glicerofosfolipidów, zwanych także fosfatydami, sfingolipidów i steroli. Glicerofosfolipidy i fosfosfingolipidy noszą wspólną nazwę fosfolipidów. Fosfolipidy i sterole są podstawowymi cząsteczkami błon biologicznych. Tworzą półpłynną, asymetrycznie zbudowaną dwuwarstwę lipidową, w której wyróżnia się warstwę lipidów E (od strony środowiska) oraz warstwę lipidów P (od strony cytoplazmy). Glicerofosfolipidy są syntetyzowane w warstwie P retikulum endoplazmatycznego, a także w aparacie Golgiego. W retikulum endoplazmatycznym syntetyzowane są także sterole i tu ma początek biosynteza sfingolipidów, kontynuowana w aparacie Golgiego.

Nowo zsyntetyzowane lipidy błonowe przemieszczane są wewnątrz komórki jako:
(1) pęcherzyki błonowe w procesie uwalniania z błony donorowej i fuzji z błoną akceptorową, (2) w procesie egzocytozy jako pojedyncze cząsteczki

z udziałem białkowych przenośników lipidów, a także (3) poprzez kontakt i wymianę lipidów między błonami, również z udziałem przenośników. Cholesterol jest głównym sterolem błon komórek zwierzęcych, a jedynym w błonach komórek ssaków. Reguluje płynność błony i jest składnikiem mikrodomen błonowych, takich jak kaweole i tratwy lipidowe.

Ekspresja genów

Wyrażenie zawartej w genach informacji genetycznej w postaci cech struktury i funkcji komórki (fenotypu komórkowego). Ekspresja genów wymaga najczęściej dwóch procesów: transkrypcji (syntezy RNA) i translacji (syntezy białka na matrycy mRNA). W przypadku rRNA i tRNA zachodzi jedynie transkrypcja. Regulacja ekspresji genów może odbywać się w czasie transkrypcji i translacji oraz w czasie potranskrypcyjnych i potranslacyjnych modyfikacji produktów (RNA i białek). Poszczególne typy komórek zróżnicowanych mają odmienne wzory ekspresji genów, tj. charakterystyczny dla danego typu/linii komórek zestaw genów ulegających ekspresji

Elektroforeza

Metoda, w której wykorzystuje się zjawisko poruszania się cząstek obdarzonych ładunkiem w polu elektrycznym; szybkość poruszania zależy również od wielkości i kształtu cząsteczki. Metoda pozwala na rozdzielenie m.in. białek i kwasów nukleinowych.

Endocytoza i kaweole

Pobieranie substancji do komórki w formie otoczonych błoną pęcherzyków. Istnieją różne mechanizmy endocytozy: fagocytoza, pinocytoza, transport tranzytowy. W wielu komórkach obserwuje się liczne, regularne wgłębienia błony komórkowej o średnicy 50–100 nm, które nazwano kaweolami. Kaweole są morfologicznie uporządkowanymi domenami błony komórkowej i stanowią jedną z form tratw lipidowych. Tratwy lipidowe zawierają dużo cholesterolu i sfingolipidów oraz białka receptorowe wielu komórkowych układów sygnalizacji. Składnikami struktury kaweoli są charakterystyczne białka nazywane kaweolinami.

Epigenom i starzenie

Starzeniu towarzyszą głębokie zmiany epigenomu składającego się z:

- kilkudziesięciu milionów par cytozyna/guanina (CG) DNA, w których cytozyna może być metylowana,
- z zagęszczeń CG DNA nazywanych **wyspami CG,**
- **kodu histonowego,**
- **mikroRNA.**

Pomiędzy urodzeniem a wiekiem starczym ogólna ilość cytozyny par CG ulega stopniowej hipometylacji, ale u ludzi starzejących się cytozyna wysp CG jest hipermetylowana. Ponieważ większość CG wysp znajduje się w obrębie promotorów ważnych genów, ich hipermetylacja prowadzi do wyciszenia tych genów. Powoduje to hamowanie produkcji białka p53, białek rodziny *INH4* (hamują cykl komórkowy), białek koaktywatorów transkrypcji, PCG (reguluje biogenezę mitochondriów, wytwarzanie ATP i metabolizm), dysmutazy nadtlenkowej (jeden z antyoksydantów), syntazy NO, lipooksygenazy i wielu innych. Jest to powodem zmian strukturalnych i pogorszenia funkcji komórek oraz zwiększenia ich śmiertelności, czyli starzenia entropowego, któremu towarzyszą choroby wieku starczego – degeneracyjne i nowotwory.

Faza G1

Jest okresem między końcem mitozy i początkiem syntezy DNA, kiedy komórka podejmuje decyzję, czy pozostać w cyklu, przekraczając **punkt restrykcyjny (R)**, czy też wyjść z cyklu do stanu spoczynkowego G0, czy popełnić samobójstwo, czy zróżnicować się lub wejść na drogę starzenia. Przekroczenie punktu R wymaga nagromadzenia substratów i syntezy białek, a szczególnie cykliny D, która działa jak czujnik substancji mitogennych. Cyklina łączy się następnie z kinazą CDK4/6, fosforylując i unieczynniając białko RB. To aktywuje czynnik transkrypcji E2F i transkrypcję cykliny E oraz polimerazy DNA. Kompleks cyklina E/CDK2 powoduje przejście G1 → S. Punkt R nazywany jest także **punktem kontrolnym G1,** monitorującym nieprawidłowości struktury DNA. Takie nieprawidłowości zatrzymują cykl w fazie G1 aż do ich reperacji.

Faza G2

Jest okresem życia komórki między końcem fazy S i początkiem mitozy. W tej fazie narasta stężenie cykliny B1, która łączy się z kinazą CDK1 i fosforyluje histon 1, laminy jądrowe, białka centrosomu i MAP, co prowadzi do przejścia G2 → M. Uszkodzenia DNA oraz zbyt małe komórki są tutaj monitorowane (**punkt kontrolny G2**) z pomocą kinazy Chk, białka p53 oraz innych kinaz, a przejście G2 → M jest hamowane do czasu reperacji DNA lub powiększenia komórek.

Faza S: podwojenie genomu (DNA) i epigenomu (hemimetylacja cytozyny DNA i odtworzenie kodu histonowego)

Synteza DNA jest typu semikonserwatywnego i trwa 6–8 godz. Specjalny zestaw białek zapobiega ponownej syntezie DNA w tej samej fazie S. Synteza mitochondrialnego DNA, podobnie jak synteza uszkodzonych fragmentów DNA, może zachodzić w całej interfazie. W fazie S poza syntezą DNA następuje powielenie i odtworzenie epigenomu, tj. hemimetylacja cytozyny nowych nici DNA, oraz rekonstruowany jest kod histonowy sprzed syntezy DNA. We wczesnej fazie S syntetyzowany jest genom i epigenom euchromatyny zawierającej czynne geny, a w późnej fazie S – genom i epigenom heterochromatyny zawierającej nieaktywne geny. Gdy DNA komórki jest uszkodzony, faza S jest hamowana przez białko p53 (**punkt kontrolny fazy S**) do czasu jego reperacji.

Fibronektyna

Glikoproteina ECM mająca domeny do łączenia z komórkami, kolagenem i GAG. Pośredniczy w łączeniu komórek z cząsteczkami ECM.

Filamenty pośrednie

Włókienka cytoszkieletu o średnicy ok. 10 nm zbudowane z różnych białek, swoistych dla poszczególnych typów tkanek. Filamenty pośrednie charakteryzują się dużą wytrzymałością na stresy mechaniczne i działanie substancji chemicznych. Tworzą sieci mechanicznie stabilizujące komórki i tkanki. W komórkach nabłonkowych biorą udział w tworzeniu połączeń międzykomórkowych (desmosomów i hemidesmosomów), w tkance mięśniowej stabilizują strukturę miofibrylli, a w neuronach wypustki.

Fuzja błon

Powszechnie występujący proces w komórkach, np. podczas endocytozy, wydzielania. W embriogenezie fuzja komórek mięśniowych zachodzi podczas miogenezy. Sztucznie wywołana fuzja komórki nowotworowej (szpiczaka) daje hybrydę, nazywaną hybrydomą, limfocytu B i wytwarzającą immunoglobulinę monoklonalną. Immunoglobuliny monoklonalne są wykorzystywane m.in. w diagnostyce i leczeniu chorych.

GAG

Glikozaminoglikany (GAG) są wielocząsteczkowymi polimerami dwucukrów: heksozaminy i kwasu uronowego. Mają charakter polianionów wiążących duże ilości wody i elektrolitów. Są głównym składnikiem proteoglikanów, które mogą łączyć się z innymi cząsteczkami ECM.

Genom i starzenie

Inaktywacja pojedynczych genów komórek drożdży, robaków, muszki owocowej, myszy i ludzi prowadzi albo do wydłużenia życia i hamowania starzenia (np. gen daf2), albo do przyspieszenia starzenia i skrócenia życia (np. geny klotho, *BRCA1*, *HELQ*, *GH*, *IGF1*). Układ immunologiczny jest zaprogramowany genetycznie tak, że maksimum jego rozwoju przypada przed pokwitaniem, z późniejszą inwolucją. Nasila to z wiekiem pojawianie się stanu zapalnego i obniża odporność organizmu.

Geny homeotyczne

Geny zawierające konserwatywną ewolucyjnie sekwencję nukleotydową zbudowaną z około 180 par zasad, zwaną homeoboksem. Ekspresja genu homeotycznego prowadzi do utworzenia białka, którego część stanowi tzw. homeodomena, 61-aminokwasowy odcinek powstały na matrycy homeoboksu. Podobnie jak inne motywy wiążące DNA (palce cynkowe, zamki leucynowe i in.), homeodomeny mają zdolność do oddziaływania z sekwencjami regulatorowymi DNA

i wpływają na proces transkrypcji (są czynnikami transkrypcyjnymi). Geny homeotyczne pełnią istotną funkcję w determinacji procesów rozwojowych. Mutacje niektórych genów homeotycznych prowadzą do powstawania poważnych deformacji rozwojowych polegających na tworzeniu dobrze wykształconych organów w miejscu innych narządów (proces ten nosi nazwę homeozy), np. u muszki owocowej *Drosophila melanogaster* w miejscu czułków pojawiają się odnóża.

Geny supresorowe nowotworów

Geny, które hamują proliferację komórek. Obecność jednego prawidłowego allelu genu supresorowego w komórce wystarcza, by nie miała ona charakteru nowotworowego. Utrata drugiego allelu powoduje natomiast brak białka hamującego cykl komórkowy, co przyczynia się do transformacji komórki w nowotworową.

Glikokaliks

est zbudowany z łańcuchów cukrowcowych glikolipidów i glikoprotein błonowych na powierzchni komórki. Bierze udział w oddziaływaniach między komórkami oraz substancją międzykomórkową.

Hiperplazja

Zwiększenie rozmiarów i masy tkanki zachodzące na skutek wzrostu liczby podziałów komórkowych (proliferacji komórek).

Hipertrofia

Zwiększenie się rozmiarów komórek prowadzące na ogół do wzrostu masy i rozmiarów tkanki/narządu.

Hipoteza chemiosmotyczna Mitchella

Hipoteza chemiosmotyczna zakłada, że energia uwalniana w czasie transportu elektronów przez łańcuch oddechowy zostaje wykorzystana do tworzenia w poprzek wewnętrznej błony mitochondrialnej gradientu protonowego, niezbędnego jako siła napędowa syntezy ATP. Czynnikiem sprzęgającym transport elektronów z fosforylacją oksydacyjną jest więc gradient H^+. Kompleksy I, III i IV wypompowują protony z matriks do przestrzeni międzybłonowej dzięki zmianom konformacyjnym wywołanym przez energię uwalnianą podczas dużego spadku potencjału oksydoredukcyjnego w trzech miejscach fosforylacyjnych. Nierównomierne rozłożenie H^+ po obu stronach błony prowadzi do powstania ΔpH i $\Delta\psi$, razem tworzących siłę protonomotoryczną (Δp).

Hodowla komórek

Utrzymywanie przy życiu komórek poza ich naturalnym mikrośrodowiskiem (*in vitro*) przez umieszczenie ich w odpowiednich pożywkach, zawierających niezbędne do metabolizmu komórkowego substancje odżywcze, regulacyjne i jony.

Homogenizacja

Mechaniczne rozdrobnienie w płynie komórek lub tkanek, w wyniku czego uzyskuje się homogenat – zawiesinę składników komórkowych (jądra, mitochondria itp.) lub też ich fragmentów.

Hybrydyzacja (kwasów nukleinowych)

Wysoce swoiste łączenie się komplementarnych fragmentów pojedynczych łańcuchów kwasów nukleinowych. Umożliwia wykrycie odcinka DNA lub RNA o określonej sekwencji nukleotydów za pomocą znakowanej sondy DNA lub RNA o komplementarnej sekwencji nukleotydów – w materiale przygotowanym zarówno do badań biochemicznych, jak i mikroskopowych (hybrydocytochemia, hybrydyzacja *in situ*).

IgCAM

Duża grupa CAM mająca domeny podobne do immunoglobulin. Tworzą połączenia homofilowe z IgCAM lub heterofilowe z innymi CAM. Tworzą przejściowe lub trwałe połączenia w układzie nerwowym i ułatwiają migrację komórek.

Immunocytochemia

Metoda, która opiera się na bardzo wysokiej swoistości wiązania antygenu z przeciwciałem, znakowanych przez przyłączenie do nich substancji widocznych w obrazie mikroskopowym. Pozwala wykrywać pojedyncze rodzaje białek występujących w obrębie komórek i substancji międzykomórkowej.

Indukcja

Rodzaj oddziaływań międzykomórkowych, w którym jedna grupa komórek (komórki indukujące) wpływa na kierunek różnicowania innej grupy komórek (komórki indukowane). Mechanizm oddziaływań indukcyjnych polega na interakcji produkowanego przez komórkę indukującą ligandu (czynnika indukcyjnego) z obecnym na powierzchni komórki indukowanej receptorem. Pobudzenie receptora generuje ciąg reakcji wewnątrzcytoplazmatycznych (transdukcja sygnału indukcyjnego), których końcowym efektem jest uaktywnienie czynników transkrypcyjnych i ustalenie nowego wzoru ekspresji genów w komórce.

Indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste (iPS, ang. *induced Pluripotent Stem*)

Dojrzałe komórki somatyczne, do których za pomocą wektora wprowadzono geny (np.: Sox2, Oct4, Klf4, nanog) odpowiedzialne za pluripotencję i podziały komórkowe. Komórki iPS mogą być indukowane odpowiednimi czynnikami do różnicowania w różne tkanki organizmu.

Informacja pozycyjna

Określenie zdolności komórek do interpretacji swego położenia w tkance/narządzie, a tym samym do ustalenia sposobu różnicowania w zależności od zajmowanego miejsca (pozycji) w zarodku.

Informator pierwotny (ang. *first messenger*)

Czynnik fizyczny lub chemiczny, będący nośnikiem informacji odbieranej przez komórki. W czynnikach fizycznych informacja jest zakodowana w ich właściwościach i wskaźnikach fizycznych (np. długość, częstotliwość fali, ilość przenoszonej energii). W przypadku czynników chemicznych informacja jest zawarta w budowie chemicznej i konformacji przestrzennej cząsteczki.

Informator wtórny (ang. *second messenger*)

Związek chemiczny powstający dzięki aktywności enzymów aktywowanych w wyniku przeniesienia informacji przez receptor do wnętrza komórki. Informatory wtórne pełnią funkcje bezpośrednich lub pośrednich aktywatorów kinaz i fosfataz serynowo-treoninowych. Typowymi informatorami wtórnymi są: cykliczne nukleotydy, pochodne fosfolipidów błonowych oraz jony wapnia.

Inhibitory łańcucha oddechowego i fosforylacji oksydacyjnej

Znane są inhibitory hamujące aktywność poszczególnych kompleksów łańcucha oddechowego (rotenon, amytal, piericydyna A, malonian, antymycyna, myksotiazol, cyjanek, azydek i tlenek węgla) oraz inhibitory fosforylacji oksydacyjnej, które hamują aktywność syntazy ATP (oligomycyna), blokują wymianę ADP/ATP (atraktylozyd, karboksyatraktylozyd i kwas bongkrekowy) albo, przyczyniając się do przepuszczalności wewnętrznej błony dla H^+, niwelują Δp (DNP, FCCP).

Integryny

Umożliwiają łączenie się komórek z cząsteczkami ECM, m.in.: lamininą, fibronektyną i kolagenem. Tworzą połączenia zwierające: hemidesmosomy i przyczepy ogniskowe. Część integryn łączy się z IgCAM innych komórek, umożliwiając przechodzenie leukocytów i komórek nowotworowych przez ścianę naczyń krwionośnych.

Inwolucja

Proces prowadzący do zaniku narządu wywołany fizjologicznym niedoborem substancji koniecznych do prawidłowego funkcjonowania lub związany z wiekiem osobnika.

Izolacja komórek

Technika prowadząca do uzyskania zawiesiny komórek, którą uzyskuje się w wyniku mechanicznego rozdrobnienia fragmentu tkanki lub narządu i potraktowania enzymami trawiącymi substancję międzykomórkową.

Jąderko – struktura i funkcje

Jąderka są aktywnymi domenami jądra komórkowego związanymi z syntezą prekursorów rybosomów. Podstawowe ich składniki to: ośrodki włókniste, gęsty składnik włóknisty, składnik ziarnisty, chromatyna związana z jąderkiem oraz wakuole jąderkowe. Ze względu na rozmieszczenie oraz proporcje składników jąderka można wyróżnić kilka typów morfologiczno-czynnościowych jąderek. Wysoką aktywność transkrypcyjną reprezentują jąderka gąbczaste i zwarte. Jąderka z segregacją składników oraz jąderka resztkowe są morfologicznym wyrazem zahamowania syntezy rRNA.

Kadheryny

Łączą się z kadherynami innych komórek, wytwarzając stabilne połączenia zwierające: obwódki przylegania i desmosomy. Desmogleiny są rodzajem kadheryn tworzących desmosomy.

Kaspazy

Rodzina proteaz cysteinowych hydrolizujących wiązania peptydowe C-końcowe od reszt kwasu asparaginowego. Można je podzielić na kaspazy inicjatorowe (2, 8, 9, 10), kasapzy egzekutorowe (3, 6, 7) oraz kaspazy nieapoptotyczne (1, 4, 5), związane z procesami zapalnymi. Występują w komórkach jako prokaspazy, ulegające aktywacji wskutek dimeryzacji i ograniczonej proteolizy.

Kinazy i fosfatazy białkowe (ang. *protein kinases/phosphatases*)

Enzymy zdolne do fosforylacji lub defosforylacji reszt serynowych i treoninowych (kinazy/fosfatazy serynowo-treoninowe) lub tyrozynowych (kinazy/fosfatazy tyrozynowe) białek. Procesy fosforylacji lub defosforylacji białek są jednym z głównych mechanizmów aktywacji lub inaktywacji wielu białek komórkowych (w tym białek strukturalnych, enzymów, czynników transkrypcyjnych) i decydują tym samym o wystąpieniu efektu biologicznego i, w konsekwencji, o funkcjach komórki. W przypadku receptorów dla cytokin i cząsteczek regulujących odpowiedź immunologiczną kinazy i fosfatazy białkowe pełnią również funkcje czynników przenoszących sygnał do wnętrza komórki.

Klonalny rozwój nowotworu

Podczas kancerogenezy zmiany genetyczne zachodzą w komórce 4–5 razy, zanim przekształci się ona w komórkę złośliwą.

Klon komórek

Grupa identycznych genetycznie komórek wywodząca się z jednej komórki wyjściowej.

Klon komórkowy

Potomstwo jednej komórki rodzicielskiej.

Klonowanie

W inżynierii genetycznej zabiegi prowadzące do otrzymania osobników identycznych pod względem genetycznym zarówno między sobą, jak i z osobnikiem „rodzicielskim". Technika klonowania polega na uzyskiwaniu zarodków w wyniku transplantacji diploidalnych jąder komórek somatycznych pochodzących z organizmu „rodzicielskiego" do pozbawionych jądra komórek jajowych.

Kolagen

Zasadnicze białko ECM, tworzące głównie włókna. Niektóre typy kolagenu wchodzą w skład błon podstawnych lub łączą włókna kolagenowe między sobą.

Komórka NK (ang. *natural killer*)

Komórka posiadająca zdolność spontanicznego zabijania komórek nowotworowych i zakażonych wirusem.

Komórka pluripotencjalna

Komórka zdolna do różnicowania się w dowolny typ komórek somatycznych organizmu (poza komórkami tkanek pozazarodkowych). Z komórek pluripotencjanych powstają wszystkie tkanki organizmu.

Komórka totipotencjalna

Komórka zdolna do wytworzenia wszelkich typów komórek zróżnicowanych, charakterystycznych dla danego organizmu. W pełni totipotencjalna jest zapłodniona komórka jajowa (zygota) i pierwsze blastomery w etapach wzrostu przedimplantacyjnego, dające początek tkankom zarodka oraz tkankom pozazarodkowym.

Komórki macierzyste

Rodzaj niezróżnicowanej komórki, która ma jednocześnie zdolność do samoodnawiania się i do tworzenia zróżnicowanego potomstwa. Obecność komórek macierzystych jest jednym z warunków stałej odnowy tkankowej, np. tkanki nabłonkowej, krwionośnej.

Komórki odpowiedzi immunologicznej

Niejednorodna grupa komórek, które zaangażowane są w generowanie specyficznej, ukierunkowanej odpowiedzi immunologicznej. Głównymi komponentami komórkowymi swoistej odpowiedzi immunologicznej są limfocyty T i B oraz liczne komórki uczestniczące w prezentacji antygenu (komórki dendrytyczne). Komórkami biorącymi udział w odpowiedzi nieswoistej są makrofagi, granulocyty i komórki NK. Ze względu na rolę w procesach dojrzewania limfocytów, do komórek układu immunologicznego zalicza się również komórki zrębu grasicy i mikrośrodowiska szpiku kostnego.

Komórki ukierunkowane (ang. *committed cells*)

Komórki ograniczone do jednego kierunku różnicowania. Wykazują dużą aktywność podziałową, lecz nie mają zdolności do samoodnawiania się. Proliferacja komórek ukierunkowanych przyczynia się do zwiększenia liczby zróżnicowanych komórek jednego typu.

Kompleks pora jądrowego (*NPC*, ang. *nuclear pore complex*)

Makromolekularny kompleks wielu białek (**nukleoporyn**), który reguluje transport makrocząsteczek pomiędzy jądrem a cytoplazmą, pozwalając na swobodny przepływ wody, metabolitów i białek o masie do ~60 kDa.

Kompleks SNARE

Kompleks białek, których obecność stwierdza się zarówno w błonach pęcherzyków synaptycznych, jak i w błonie presynaptycznej, warunkujących kotwiczenie i fuzję pęcherzyków synaptycznych z błoną presynaptyczną i wydzielenie ich zawartości.

Kompleks sygnalizacyjny śmierci, DISC (ang. *death inducing signaling complex*)

Kompleks aktywowanych ligandami receptorów śmierci cytoplazmatycznych białek adaptorowych i prokaspaz inicjatorowych 8 i/lub 10, prowadzący do ich aktywacji, a co za tym idzie – do transdukcji sygnału śmierci, charakteryzujący szlak zewnątrzpochodny inicjacji apoptozy.

Kompleks TOM/TIM

Kompleks kanałowy zewnętrznej (TOM, ang. *transport through outer membrane*) i wewnętrznej (TIM, ang. *transport through inner membrane*) błony mitochondrialnej. Uczestniczy w imporcie białek z cytoplazmy do macierzy mitochondrium, co następuje poprzez wytworzenie wspólnego kompleksu TIM/TOM, umożliwiającego ominięcie przestrzeni międzybłonowej.

Konekson (ang. *connexon*)

Kanał zbudowany z białek zwanych koneksynami, umożliwiający przekazywanie informacji między komórkami za pomocą prądu jonowego.

Kontrola ekspresji genów

Procesy regulacyjne wpływające na wydajność transkrypcji i translacji informacji zawartej w kwa-

sach nukleinowych nazywa się kontrolą ekspresji genu. Najważniejszym etapem kontrolnym jest regulacja transkrypcji, która odbywa się głównie przez modulację aktywności czynników transkrypcyjnych wiążących się ze swoistymi odcinkami genów, tzw. sekwencjami promotorowymi i wzmacniającymi.

Kontrola oddechowa i współczynnik kontroli oddechowej

Ilość syntetyzowanego ATP jest kontrolowana przez intensywność metabolizmu. Duże stężenie ADP w komórce przyspiesza działanie syntazy ATP, co z kolei przyspiesza transport elektronów i zużycie O_2, zwiększa aktywność cyklu kwasu cytrynowego i pośrednio glikolizy oraz utleniania kwasów tłuszczowych. Gdy cały ADP zostanie ufosforylowany do ATP, szybkość transportu elektronów maleje, a zatem i zużycie O_2. Kontrola oddechowa jest więc procesem regulującym intensywność oddychania w zależności od zapotrzebowania komórki na ATP. Wskaźnikiem stosowanym do oceny jakości preparatu mitochondrialnego jest współczynnik kontroli oddechowej.

Kora komórki

Zewnętrzna strefa komórki, utworzona przez krótkie filamenty aktynowe i spektrynowe oraz liczne białka łączące je z błoną komórkową. Struktura ta nadaje kształt komórkom, zwiększa ich wytrzymałość oraz uczestniczy w transporcie pęcherzykowym.

Laktoferyna

Białko wiążące żelazo, które jest niezbędne do prawidłowego funkcjonowania bakterii.

Laminina

Glikoproteina błon podstawnych łącząca integryny komórek z kolagenem typu IV, entaktyną i GAG. Pośredniczy w łączeniu komórek z błonami podstawnymi.

Leczenie nowotworów

Leczenie nowotworów – zabieg chirurgiczny i napromienianie – jest na ogół skuteczne wtedy, gdy guz został wcześnie rozpoznany. Pozostawione po tych zabiegach komórki nowotworu mogą dać początek nawrotowi guza. Chemioterapia polega na podawaniu choremu substancji hamujących wzrost nowotworu. Niepożądanym skutkiem leczenia chemioterapeutykami jest zmniejszenie odporności chorego na zakażenia bakteryjne i wirusowe. Możliwe jest również leczenie chorego metodami immunologicznymi, ale tylko wtedy, gdy na początku leczenia masa guza nowotworowego jest mała.

Liczba i rozmieszczenie mitochondriów w komórce

Kształt, wielkość, liczba i rozmieszczenie mitochondriów w komórce zmieniają się w zależności od rodzaju i funkcji komórki. Mitochondria mogą być zlokalizowane na całym obszarze komórki bądź tylko w jej części przypodstawnej lub też na obwodzie komórki. W tkance mięśniowej poprzecznie prążkowanej mitochondria, tworząc szeregi, występują między licznymi miofibrylami.

Ligand (ang. *ligand*)

Cząsteczka chemiczna zdolna do swoistego wiązania się z receptorem, najczęściej w wyniku dopasowania przestrzennego i/lub wzajemnego oddziaływania fizykochemicznego (słabe wiązania wodorowe, jonowe i elektrostatyczne, siły van der Waalsa).

Lizozym (muramidaza)

Enzym o silnym działaniu bakteriobójczym.

Lokalizacja i topografia błon mitochondrialnych

Mitochondria są otoczone dwiema błonami. Różnią się one rodzajem, zawartością lipidów, białek, przepuszczalnością i funkcją. Wewnętrzna błona tworzy liczne grzebienie mitochondrialne, w których znajdują się enzymy kompleksów łańcucha oddechowego i syntaza ATP. Wyróżnia się przestrzeń międzybłonową (przedział zewnętrzny) i matriks mitochondrialną (przedział wewnętrzny). Przedziały są molekularnie i funkcjonalnie od-

mienne. Matriks mitochondrialna pod względem enzymatycznym jest najbogatszym i najbardziej zróżnicowanym przedziałem, a zawarte w niej układy enzymatyczne zmieniają się w zależności od rodzaju komórki.

Łańcuch oddechowy

Łańcuch oddechowy składa się z czterech transbłonowych kompleksów enzymatycznych: dehydrogenazy NADH (I), dehydrogenazy bursztynianowej (II), kompleksu cytochromów bc_1 (III) i oksydazy cytochromowej (IV). Transportują one elektrony pochodzące z substratów cyklu kwasu cytrynowego do O_2, wykorzystując takie przenośniki elektronowe, jak: dwa rodzaje centrów żelazo-siarkowych, cytochromy typu b, c i a oraz atomy miedzi. Dehydrogenaza NADH wprowadza do łańcucha oddechowego elektrony z matriksowej puli NADH za pośrednictwem FMN, podczas gdy dehydrogenaza bursztynianowa przekazuje do łańcucha oddechowego elektrony z bursztynianu przekształconego w fumaran, a odebrane przez FAD. W skład łańcucha oddechowego, poza wielkimi kompleksami enzymatycznymi, wchodzą dwa ruchome przenośniki elektronów, hydrofobowy ubichinon (koenzym Q) i małe peryferyczne białko cytochrom c. Ubichinon przenosi elektrony z kompleksów I i II na kompleks III. Odbiera też elektrony z flawoprotein związanych z czółenkiem glicerolofosforanowym i β-oksydacją kwasów tłuszczowych. Cytochrom c przenosi elektrony z kompleksu III na kompleks IV.

MAP (białka towarzyszące mikrotubulom)

Grupa białek łączących się z mikrotubulami, wpływająca na ich stabilizację oraz funkcje.

Martwica (nekroza)

Proces śmierci komórek wywołany nieodwracalnym uszkodzeniem komórek przez takie czynniki, jak niedotlenienie, duże dawki promieniowania, substancje toksyczne, wysoka temperatura itp. Charakteryzuje się chaotyczną inaktywacją wszystkich szlaków biochemicznych, denaturacją białek, obrzękiem cytoplazmy, uwolnieniem enzymów lizosomalnych, utratą ciągłości błony komórkowej i rozpadem komórki, albo też przeciwnie jej obkurczeniem. Zmiany te wywołują silny odczyn zapalny

Metaplazja

Proces transformacji jednego zróżnicowanego typu komórek w drugi w odpowiedzi adaptacyjnej na chroniczne podrażnienie patogenem lub karcynogenem. Do metaplazji dochodzi w wyniku regeneracji tkanek albo pod wpływem bodźców środowiskowych, albo na skutek przewlekłego działania czynników uszkadzających. Zachodząca we wczesnych etapach embriogenezy naturalna metaplazja nosi nazwę transdyferencjacji.

Metoda FRET

Metoda umożliwiająca uwidocznienie interakcji pomiędzy cząsteczkami znakowanymi fluorescencyjnie, oparta na bezpośrednim przekazaniu energii z jednego fluorochromu na drugi.

MHC

Cząstecki głównego układu zgodności tkankowej odpowiedzialne za prezentację epitopów białkowych w postaci rozpoznawalnej przez receptory limfocytów T. Wyróżnia się dwie klasy: MHC klasy I – obecne na powierzchni wszystkich komórek jądrzastych, odpowiedzialne za prezentację antygenów endogennych komórki, oraz MHC klasy II, których ekspresją charakteryzują się komórki profesjonalnie prezentujące antygeny pochodzenia egzogennego w komórce.

Mikrofilamenty (filamenty aktynowe)

Polimery zbudowane z cząsteczek aktyny. Mikrofilamenty łączą się w pęczki lub sieci, które nadają komórkom kształt i wytrzymałość, tworzą elementy szkieletowe stabilnych struktur komórkowych (mikrokosmków), są ważnym elementem kory komórkowej i połączeń międzykomórkowych (obwódek zwierających i przyczepów ogniskowych). Tworzą struktury mniej stabilne związane z ruchem komórki (lamelipodia i filopodia), przyleganiem komórek do podłoża (włókienka naprężeniowe) i z cytokinezą (pierścień kurczliwy). W tkance mięśniowej występują w postaci miofilamentów cienkich, które wraz z filamentami grubymi przyczyniają się do skurczu mięśnia.

Mikrotubule

Białkowe rurki o średnicy ok. 25 nm powstające w wyniku polimeryzacji heterodimerów zbudowanych z α i β tubuliny. Polimeryzacja i depolimeryzacja podjednostek tubulinowych przyczynia się do zmian długości mikrotubul. Miejscem inicjalnego formowania się mikrotubul są centra nukleacji zawierające γ tubulinę (np. w centrosomie). Obecność cytoszkieletu mikrotubularnego umożliwia ukierunkowany ruch wewnątrzkomórkowy oraz warunkuje utrzymanie kształtów komórki. Stabilne układy mikrotubul są elementami szkieletowymi i ruchowymi rzęsek i wici.

Mitoza (faza M)

Składa się z podziału jądra, czyli **kariokinezy,** i podziału cytoplazmy, czyli **cytokinezy.** W kariokinezie wyróżnia się profazę, prometafazę, metafazę, anafazę i telofazę. W czasie kariokinezy zanika struktura jądra, a chromatyna kondensuje, wytwarzając chromosomy mitotyczne, z których każdy dzieli się na dwie chromatydy siostrzane odprowadzane do biegunów komórki w anafazie. Zjawiskom tym towarzyszy wytworzenie, a potem rozpad wrzeciona podziałowego, fragmentacja, a następnie odbudowa otoczki jądrowej oraz rozpad, a potem rekonstrukcja jąderka.

Modyfikacje epigenetyczne

Zmiany w ekspresji genów, będące następstwem dołączania/odłączania grup metylowych do DNA, modyfikacji białek histonowych, zależnej od ATP przebudowy chromatyny, interferencji RNA. Różnorodność komórek wywodzących się z jednej komórki macierzystej jest skutkiem regulacji informacji zawartej w kodzie DNA na drodze innych mechanizmów niż zmiana sekwencji nukleotydów. Regulacja epigenetyczna istotna jest w procesach różnicowania komórek, rozwoju zarodkowego, odpowiedzi komórek na stres, transformacji nowotworowej. W odpowiadających sobie genach osobników żeńskich i męskich można obserwować różne modyfikacje epigenetyczne. Modyfikacje epigenetyczne są podstawą różnych wzorów ekspresji genów.

Morfogeny

Substancje chemiczne, których gradient stężenia w środowisku ma wpływ na zróżnicowanie komórek. Wzory (układy) przestrzennego zróżnicowania komórek w tworzącej się tkance (narządzie) zależą od kompetencji komórek do reagowania na obecność morfogenu oraz od progowych wartości jego stężenia.

Morfologia mitochondriów

Komórki aktywne metabolicznie, wykazujące duże zapotrzebowanie na ATP, mają liczne mitochondria, z silnie pofałdowaną wewnętrzną błoną i ciemną matriks mitochondrialną. Komórki starzejące się lub niezróżnicowane, w tym również niektóre komórki nowotworowe niewykazujące aktywnego metabolizmu tlenowego, mają natomiast mitochondria małe, z niewielką liczbą grzebieni mitochondrialnych i jasną matriks. Nietypowe mitochondria, zawierające cewkowate grzebienie mitochondrialne, występują w komórkach steroidogennych. Długie, zakrzywione mitochondria zlokalizowane w plemniku tworzą osłonkę mitochondrialną, funkcjonującą jako jedno organellum dostarczające energii.

Morfologia rybosomowych kompleksów transkrypcyjnych

Aktywne geny rybosomowe widoczne są po zupełnym rozproszeniu chromatyny w postaci „choinek". Często ułożone są parami rozdzielonymi przez sekwencje nieprzepisywane. Włókna DNA są gęsto pokryte wzrastającymi w kierunku transkrypcji łańcuchami transkryptów, u podstawy których znajdują się cząsteczki Pol i RNA.

Mutacje a starzenie

Mutacje DNA są skutkiem błędów dzielących się komórek lub działania toksyn, promieniowania jonizującego, UV i wolnych rodników. Średnio w ludzkim organizmie dzieli się 10 komórek/s, a w $^1/_3$ spośród nich powstają mutacje DNA. Większość mutacji jest naprawiana albo niszczona poprzez śmierć całej komórki. Pozostałe kumulują się, szczególnie w komórkach rzadko się dzielących, upośledzają funkcje komórek, prowadząc do starzenia entropowego i chorób towarzyszących

starzeniu – degeneracyjnych i nowotworowych. Szczególne znaczenie mają somatyczne mutacje mitochondrialnego DNA (mitDNA).

Mutacje genomu mitochondrialnego przyczyną zaburzeń energetycznych

Mutacje punktowe i delecje w mtDNA prowadzą do zaburzeń syntezy białek mitochondrialnych w obrębie mitochondriów i transportu elektronów wzdłuż łańcucha oddechowego, co powoduje upośledzenie fosforylacji oksydacyjnej i funkcji energetycznej mitochondriów. Kliniczna ekspresja tych zaburzeń, czyli choroba mitochondrialna, zależy od stosunku zmutowanego mtDNA do prawidłowego, gdyż w komórce koegzystują niezmutowane kopie mtDNA i takie, które zawierają patogenne mutacje.

Naprawa DNA

Mechanizmy naprawy DNA zapewniają wierność replikacji oraz stabilność genomu. Błędy w sekwencji DNA, występujące bardzo rzadko w czasie replikacji, są natychmiast usuwane przez aparat replikacyjny. Nierozpoznane i nieusunięte defekty struktury DNA prowadzą do powstania mutacji.

Neuropeptydy (ang. *neuropeptides*)

Peptydy lub białka syntetyzowane zarówno w neuronach (w obszarze perikarionu), jak i w innych komórkach organizmu. Związki o znacznie większej cząsteczce niż neurotransmitery klasyczne.

Neurotransmiter (neuroprzekaźnik) (ang. *neurotransmitter*)

Związek chemiczny uwalniany z pęcherzyków synaptycznych części presynaptycznej synapsy nerwowej. Reagując ze swoistym receptorem, doprowadza do zmiany potencjału elektrycznego błony postsynaptycznej.

Neurotransmitery klasyczne (ang. *classical neurotransmitters*)

Związki chemiczne o niewielkiej cząsteczce, pochodne aminokwasów i amin. Enzymy konieczne do ich syntezy znajdują się zarówno w komórce (perikarion), jak i w zakończeniach presynaptycznych.

Nisza komórkowa

Mikrośrodowisko komórek macierzystych, w którym zachodzą pomiędzy komórkami macierzystymi a komórkami niszy, komórkami macierzystymi a macierzą zewnątrzkomórkową, oddziaływania przez cząstki sygnalizacyjne (cytokiny, czynniki wzrostowe), czynniki mitogenne, morfogenne. Komórki niszy utrzymują komórki macierzyste w stanie uśpienia, hamują ich różnicowanie, izolują przed czynnikami indukującymi różnicowanie, apoptozę. Na utrzymanie w stanie „uśpienia" (*quiescent*) komórek macierzystych w niszy ma wpływ pH oraz stężenie tlenu w tym mikrośrodowisku. Przesunięcie komórek macierzystych na obrzeża niszy czyni je podatnymi na sygnały do podziałów, różnicowania i opuszczenia niszy

Nowotwory łagodne i złośliwe

Nowotwory, których komórki namnażają się i przeżywają nadmiernie długo, ale pozostają skupione w miejscu pierwotnego pojawienia się komórki transformowanej, nazywa się nowotworami łagodnymi. Gdy jednak komórki zyskują zdolność przedostawania się do naczyń krwionośnych lub limfatycznych oraz tworzenia przerzutów, wówczas są to nowotwory złośliwe. Przykładem jest rozwój raka okrężnicy u człowieka.

Nukleoferyny

Białka, takie jak **importyny** oraz **eksportyny**, transportujące makrocząsteczki pomiędzy jądrem a cytoplazmą poprzez kompleks pora jądrowego. Import danego białka do jądra warunkuje sekwencja **NLS** (ang. *nuclear localization signal*), podczas gdy eksport do cytoplazmy zależy od **NES** (ang. *nuclear export signal*).

Odpowiedź białek rozfałdowanych (UPR)

Zespół szlaków biochemicznych ulegających aktywacji pod wpływem pojawienia się w świetle siateczki śródplazmatycznej nadmiaru nieprawidłowo

sfałdowanych białek. UPR prowadzi do indukcji specyficznych czynników transkrypcyjnych (**XBP1, ATF6**) oraz wstrzymania translacji większości białek zależnej od fosforylacji czynnika inicjacji eIF2α. Jeżeli UPR nie jest w stanie skutecznie przeciwdziałać nadmiarowi rozfałdowanych białek, wówczas prowadzi do apoptozy.

Odpowiedź nabyta (swoista)

Oparta na aktywności immunokompetentnych limfocytów T i B oraz przeciwciał wytwarzanych przez limfocyty B. Charakteryzuje się specyficznością, pamięcią immunologiczną, różnorodnością, zdolnością do samoograniczania oraz tolerancją immunologiczną.

Odpowiedź wrodzona (nieswoista)

Stanowi pierwszą linię obrony organizmu przed patogenami. Jest oparta na szybko aktywowanych, ale mało precyzyjnych mechanizmach, które nie prowadzą do wytworzenia pamięci immunologicznej. Jest uwarunkowana istnieniem zarówno czynników humoralnych (regulatorów odporności), jak i barier fizycznych i chemicznych oraz komórek. Do głównych komponentów komórkowych odpowiedzi wrodzonej zalicza się: monocyty, makrofagi, granulocyty oraz inne, bliżej niezwiązane z układem odpornościowym komórki, np. nabłonkowe.

Ograniczenie kaloryczne. Peroksyredoksyna 1

Ograniczenie kaloryczne, bez stwarzania warunków niedożywienia, powstrzymuje starzenie i przedłuża życie. Jest poprzedzane: obniżeniem stężenia glukozy, insuliny i trijodotyroniny we krwi, zwiększeniem czułości komórek na insulinę, obniżeniem temperatury, polepszeniem reperacji DNA, zwiększeniem częstości apoptoz oraz opóźnieniem zmian starczych w układzie nerwowym i wewnątrzwydzielniczym. Zmniejsza wytwarzanie wolnych rodników i wydłuża życie ssaków laboratoryjnych o 20%. Enzymami odpowiedzialnymi za dobrotliwe efekty ograniczenia kalorycznego są antyoksydanty – **peroksyredoksyna 1** oraz **sulfiredoksyna 1** reaktywująca zużytą peroksyredoksynę. Dobrotliwe skutki ograniczenia kalorycznego wywołuje modyfikacja epigenomu poprzez ograniczenie dostępności metioniny – donoru grup metylowych dla metylacji cytozyny DNA, lub poprzez aktywację sirtuiny 1 i 5.

Onkogeny, onkogeny wirusowe

Onkogen jest to zmutowany gen kodujący białko kierujące komórkę do podziału. Onkogeny pierwotnie wykryto w retrowirusach onkogennych. Okazało się, że onkogeny te nie są wykorzystywane przez wirusy do replikacji, mogą być natomiast przez nie przenoszone do komórki, powodować ich transformację nowotworową.

Oporność wielolekowa (nie mylić z odpornością)

Spowodowana jest nadmierną aktywnością układu transportującego z komórek substancje toksyczne. Jest to transport aktywny, zużywający ATP. Taka oporność jest przyczyną niepowodzeń w leczeniu schorzeń bakteryjnych i nowotworowych.

Organizacja i funkcjonowanie genów

Geny są odcinkami DNA kodującymi odrębne jednostki transkrypcyjne. U eukariota geny mają charakter rozproszony i składają się z odcinków kodujących białko – eksonów, oraz odcinków niekodujących – intronów. DNA intronów zawiera liczne powtórzenia określonych sekwencji DNA.

Otoczka jądrowa

Nukleoplazmę od cytoplazmy oddziela otoczka jądrowa, która jest dynamiczną strukturą przystosowaną do intensywnej wymiany jądrowo-cytoplazmatycznej. Odbywa się ona przez kanały w otoczce, w których zlokalizowane są wyspecjalizowane struktury zwane jądrowymi kompleksami porowymi.

p53

Białko zwane strażnikiem genomu. Nieodwracalne uszkodzenie DNA powoduje aktywację p53 prowadzącą do ekspresji białek z grupy BH3, takich jak **Puma**, aktywujących białka Bak i Bax, rozpoczynające wewnątrzpochodny szlak aktywacji apoptozy.

p53 jest zmutowane w ponad 50% ludzkich nowotworów.

Pamięć komórkowa

Zdolność komórek do zachowania i dziedziczenia charakterystycznego dla danej linii komórkowej wzoru ekspresji genów. Mechanizm pamięci komórkowej może wymagać obecności odpowiednich białek regulatorowych, modyfikacji chemicznej DNA (metylacji) lub przekształcenia struktury przestrzennej chromatyny (kondensacji i dekondensacji poszczególnych regionów chromosomów).

PCR – łańcuchowa reakcja polimerazowa

Metoda umożliwiająca wykrycie i identyfikację śladowych ilości DNA (nawet pojedynczych cząsteczek); wykorzystuje się tu polimerazę, enzym replikujący DNA w urządzeniach zwanych cyklerami. Reakcja pozwala na namnożenie poszukiwanych odcinków DNA, który następnie można wykrywać innymi metodami.

Peptydaza sygnałowa

Enzym w przedziale docelowym, odcinający sekwencję sygnałową po spełnieniu przez nią roli adresującej.

Peroksyny

Peroksysomalne białka, tworzące kanały, poprzez które sfałdowane białka dostają się do światła peroksysomów z cytoplazmy.

Podstawowe zaburzenia w komórce nowotworowej

Regulacje proliferacji i procesu apoptozy są w komórkach nowotworowych zaburzone. Zmiany regulacji są spowodowane zmianami genetycznymi: niektóre protoonkogeny przekształcają się w onkogeny, a niektóre geny supresorowe nowotworów tracą ekspresję bądź funkcję. Powoduje to stałe wytwarzanie w komórce białek indukujących podziały (produkty onkogenów) oraz niedobór białek hamujących ten proces (produkty genów supresorowych).

Połączenia międzykomórkowe

Stabilne, widoczne w mikroskopie elektronowym struktury między komórkami lub komórkami i ECM, np.: połączenia zamykające, zwierające i jonowo-metaboliczne.

Połączenia zwierające

Utworzone są przez kadheryny (między komórkami) lub integryny (komórki z ECM). W połączeniach tych występują białka cytoplazmatyczne łączące CAM z filamentami cytoszkieletu (kateniny, winkulina, talina i α-aktynina – filamenty aktynowe, oraz desmoplakiny – filamenty pośrednie). Połączenia te nadają dużą wytrzymałość mechaniczną komórkom i tkankom.

Populacja komórek

Grupa komórek o tym samym fenotypie, takich samych zdolnościach proliferacyjnych i tym samym kierunku różnicowania się.

Potencjały oksydoredukcyjne (redoks)

Kolejność przenośników elektronów w łańcuchu oddechowym jest wyznaczana przez potencjały oksydoredukcyjne, będące miarą powinowactwa tych przenośników do elektronów. Ułożenie przenośników według wzrastającego powinowactwa do elektronów decyduje o tym, że reakcja przeniesienia elektronów z NADH do O_2 jest termodynamicznie korzystna, tzn. uwalnia znaczną ilość energii.

Powstawanie onkogenów w komórkach niezakażonych retrowirusem

Onkogeny mogą powstawać z protoonkogenów przez mutacje albo rearanżacje DNA. Jest kilka przyczyn powstawania onkogenów w komórkach niezakażonych retrowirusem. Są nimi: mutacje punktowe, duże homozygotyczne delecje, translokacje chromosomowe, metylacje cytozyny, amplifikacja genu, czyli jego powielenie. W komórkach

nowotworowych może też pojawić się ekspresja genu telomerazy.

Pozajądrowe struktury RNP

Struktury RNP przestrzeni interchromatynowej są morfologicznym wykładnikiem transkrypcji, metabolizmu i transportu kwasów nukleinowych oraz syntezy białek. W strefie brzeżnej chromatyny skondensowanej wyróżnia się włókna i ziarna perychromatyny odnoszące się do transkrypcji i formowania mRNA. Ponadto kontrastowanie preferencyjne z EDTA, różnicujące struktury zawierające DNA i RNA, pozwala uwidocznić w przestrzeni interchromatynowej włókna i ziarna interchromatyny, a także niejednolitą grupę struktur o niezupełnie poznanej biogenezie i funkcji – ciałka jądrowe.

Proliferacja, hipertrofia i akrecja

Proliferacja (rozrost, hiperplazja) jest pomnażaniem liczby komórek przechodzących przez cykl komórkowy. Hipertrofia (przerost) jest zwiększeniem masy pojedynczych komórek wskutek zwiększenia liczby makrocząsteczek. Akrecja jest zwiększeniem masy istoty międzykomórkowej. Losy komórek opuszczających cykl mogą być następujące:

- komórki wchodzą w następny cykl komórkowy,
- opuszczają cykl, wchodząc w stan spoczynkowy G0,
- pod wpływem cytokin, hormonów i in. czynników komórki mogą wchodzić ponownie do cyklu,
- komórki po przeprogramowaniu swojego epigenomu różnicują się (specjalizują), tracąc zdolność dzielenia się,
- wchodzą na drogę starzenia się,
- włączają program śmierci samobójczej i giną.

Proteasomy

Proteasomy są występującymi w jądrze i cytoplazmie organellami niebłoniastymi, odpowiedzialnymi za degradację większości białek w komórce. Wyróżnia się rdzeniowe **proteasomy 20S**, o strukturze pustego w środku cylindra utworzonego przez cztery pierścienie, oraz **proteasomy 26S**, powstałe przez połączenie się proteasomów 20S z dwoma cząstkami aktywatora **PA700**. Te ostatnie odpowiadają za degradację białek wyznakowanych łańcuchem poliubikwityny.

Przeciwciało (immunoglobulina)

Podstawowy element odpowiedzi typu humoralnego. Jest to substancja białkowa produkowana przez komórki plazmatyczne wykazująca zdolność do rozpoznawania i wiązania się z antygenem.

Przestrzeń interchromatynowa

Przestrzeń ograniczona otoczką jądrową między przylegającymi do niej i rozrzuconymi w nukleoplazmie skupieniami chromatyny skondensowanej. Zawiera wiele struktur ziarnistych i włóknistych o rybonukleoproteinowym składzie oraz chromatynę rozproszoną (euchromatynę).

Reakcja komórki (ang. *cell reaction*)

Określona zmiana właściwości lub zachowania się komórki w wyniku jej aktywacji za pośrednictwem specyficznego receptora. Przykładem może być depolaryzacja błony komórkowej, zmiana kształtu komórki, aktywacja lub zahamowanie określonego szlaku metabolicznego albo indukcja bądź zahamowanie ekspresji określonego genu.

Receptor (ang. *receptor*)

Cząsteczka chemiczna, najczęściej polipeptyd lub glikoproteina zlokalizowana na powierzchni lub wewnątrz komórki, związana z błonami komórkowymi lub występująca w cytoplazmie, zdolna do rozpoznawania, odbierania i przetwarzania informacji niesionej przez informator pierwotny.

Receptory jonotropowe (ang. *ionotropic receptors*)

Receptory, będące jednocześnie kanałami jonowymi. Związanie liganda (agonisty) powoduje zmiany konformacyjne receptora prowadzące do otwarcia lub zamknięcia kanału i w wyniku tego do zmiany przepuszczalności błony komórkowej dla jonów i jej depolaryzację lub hiperpolaryzację.

Receptory metabotropowe (ang. *metabotropic receptors*)

Receptory wywołujące określony efekt biologiczny w wyniku regulacji (indukcji lub zahamowania) swoistych procesów metabolicznych lub modyfikacji białek strukturalnych. Zwyczajowo nazwę tę stosowano do receptorów dla hormonów i neuropeptydów przenoszących sygnał z udziałem heterotrimerycznych białek G.

Receptory śmierci

Występujące na powierzchni komórek białka, takie jak **FAS** oraz **receptor dla TNF typu I**, których wspólną cechą jest transdukcja sygnału powodującego uruchomienie kaskady kaspaz poprzez szlak zewnątrzpochodny.

Regulacja cyklu komórkowego z zewnątrz

Na komórki może działać wiele cząsteczek sygnałowych – cytokin (w tym czynników wzrostu i różnicowania), hormonów lub cząsteczek istoty międzykomórkowej. Wiążą się one z receptorami, które włączają/wyłączają cykl komórkowy. Sygnał przekazywany jest przez błonę komórki, a następnie poprzez wiele krzyżujących się między sobą szeregów białek cytoplazmatycznych i informatorów wewnątrzkomórkowych do jądra. Dzięki krzyżowaniu się szlaków transdukcji ten sam sygnał może wywoływać włączenie lub wyłączenie cyklu albo też włączenie samobójczej śmierci komórki.

Replikacja DNA

Powielanie DNA jest złożonym, wieloetapowym, wieloenzymatycznym procesem, w którym uczestniczą helikazy – enzymy rozplatające podwójną helisę, SSB – białka stabilizujące jednoniciowy DNA, prymazy – rozpoczynające replikację, białka ruchomej obręczy, umożliwiające polimerazie DNA polimeryzację nukleotydów w nowo powstającym łańcuchu polinukleotydowym. W tym bardzo dokładnym mechanizmie zdarzają się błędne sparowania nukleotydów, które są korygowane podczas procesu zwanego redagowaniem.

Różnicowanie komórek

Proces, w którego wyniku dochodzi do stopniowej specjalizacji strukturalnej i funkcjonalnej komórek. U podstaw różnicowania leżą mechanizmy ustalające wzór ekspresji genów charakterystyczny dla danej linii komórkowej.

RT-PCR

Metoda umożliwiająca wykrycie i identyfikację śladowych ilości RNA dzięki odwrotnej transkryptazie – enzymowi syntetyzującemu DNA na matrycy RNA. W wyniku tego powstaje łańcuch komplementarnego DNA (cDNA), który jest następnie powielany za pomocą PCR.

Rzęski i witki

Trwałe wypustki komórkowe o niewielkiej średnicy, których szkielet wewnętrzny tworzy aksonema – zorganizowany zespół stabilnych mikrotubul. Obecność związanych z aksonemą białek motorycznych (dyneiny aksonemalnej) umożliwia aktywny ruch rzęsek i wici.

Selektyny

Wiążą grupy cukrowe na powierzchni innych komórek i odgrywają ważną rolę w przechodzeniu leukocytów przez śródbłonek.

Skład i struktura chromatyny

Cząsteczka DNA w chromatynie, łącząc się z białkiem, tworzy kompleks – włókno deoksyrybonukleoproteinowe (DNP). Głównym składnikiem białkowym chromatyny są 4 klasy histonów: H2A, H2B, H3 i H4. Histon H1 różni się od histonów rdzeniowych i pełni inną funkcję. Białka niehistonowe (NHP) są zaangażowane w replikację i naprawę DNA oraz ekspresję genów. Podstawową strukturą chromatyny jest włókno nukleosomowe (nukleofilament) składające się z nukleosomów oraz tzw. łącznikowego DNA. Strukturę wyższego rzędu chromatyny interfazalnej tworzy solenoid, powstały w wyniku superspiralizacji włókna nukleosomowego. W wyniku dalszej kondensacji chromatyny powstają duże pętle liczące 60–100 kpz, zakotwiczone w macierzy jądrowej.

Skład i struktura RNA

Jednoniciowy pofałdowany przestrzennie RNA w swoim składzie różni się od cząsteczki DNA obecnością rybozy, zamiast deoksyrybozy, oraz uracylu, zamiast tyminy.

Składniki DNA

Nośnik informacji genetycznej – DNA, jest zbudowany z nukleotydów. Szkielet łańcucha stanowi cukier deoksyryboza połączona z grupą fosforanową. Trzeci składnik DNA stanowi jedna z 4 zasad: dwóch purynowych (adeniny i guaniny) i 2 pirymidynowych (cytozyny i tyminy). Sekwencja zasad decyduje o zapisie informacji genetycznej. W dwuniciowej helisie zasady obu łańcuchów łączą się zgodnie z regułą komplementarności: adenina z tyminą, a guanina z cytozyną.

Struktura DNA

Łańcuchy polinukleotydowe skręcone są w prawoskrętną, dwuniciową helisę o średnicy 2 nm. Jeden skręt helisy o długości 3,4 nm zawiera 10 par nukleotydów. Jest to najczęściej występująca forma przestrzenna DNA określana jako DNA B. Plastyczność DNA sprawia, że może tworzyć lewoskrętną helisę, zwaną DNA Z, o nieco mniejszej średnicy i zygzakowatym kształcie szkieletu fosforanowo-cukrowego. Niekiedy DNA formuje się w konfigurację DNA A o największej średnicy.

Struktura rDNA

Wspólna jednostka transkrypcyjna genu rDNA zawiera 3 rodzaje sekwencji nukleotydowych: sekwencje przepisywane i obecne w dojrzałych rRNA, sekwencje rozdzielające poszczególne jednostki matrycowe w tandemach oraz sekwencje transkrybowane i obecne w pierwotnym transkrypcie, które zostają wycięte w czasie dojrzewania pre-rRNA. Sekwencje regulujące funkcję rDNA leżą w obrębie sekwencji nieprzepisywanych.

Synapsa chemiczna (ang. *chemical synapse*)

Miejsce kontaktu komórkowego, w którym dochodzi do przekazania informacji do komórki docelowej. Warunkiem przekazania informacji jest uwolnienie przez komórkę wysyłającą informację, tworzącą błonę presynaptyczną, substancji chemicznej (informatora pierwotnego) i jej reakcji z odpowiednim receptorem na błonie komórki docelowej (błonie postsynaptycznej). Przekazywanie informacji w ten sposób jest znacznie wolniejsze niż przez synapsę elektryczną. Należy jednak zaznaczyć, że pojęcie synapsy w ostatnich latach nie dotyczy już tylko synapsy nerwowej, ale podobnych połączeń między innymi rodzajami komórek, np. komórkami układu odpornościowego (synapsa immunologiczna).

Synapsa elektryczna (ang. *electric synapse*)

Miejsce kontaktu komórkowego umożliwiające bezpośrednie, szybkie przekazywanie informacji za pomocą prądu jonowego. Tego rodzaju połączenia międzykomórkowe określa się mianem neksus.

Synapsyna I

Białko umożliwiające związanie błon pęcherzyków synaptycznych z F-aktyną (białko cytoszkieletu). Aktywność wiązania jest kontrolowana przez proces fosforylacji synapsyny I.

Syntaza ATP

Syntaza ATP katalizuje fosforylację ADP do ATP. Orientacja enzymu w wewnętrznej błonie mitochondrialnej umożliwia jego współpracę z łańcuchem oddechowym; umiejscowiona w błonie podjednostka F_0 jest kanałem dla H^+, a zlokalizowana w matriks mitochondrialnej podjednostka F_1 przeprowadza syntezę ATP. Siłą napędową enzymu jest gradient H^+ utworzony z energii uwalnianej podczas transportu elektronów przez łańcuch oddechowy. Protony wchodzą do syntazy ATP przez kanał F_0 i wywołują cykliczne zmiany konformacyjne w części katalitycznej enzymu, F_1, powodujące zmiany powinowactwa miejsc katalitycznych w podjednostkach β do ADP i ATP. Podstawą cyklu jest kooperatywne działanie podjednostek wchodzących w skład F_1. Powiązanie zmian konformacyjnych w miejscach katalitycznych z przepływem H^+ przez F_0 jest możliwe dzięki temu, że syntaza ATP działa jako motor molekularny. Podczas utle-

niania NADH są syntetyzowane do 2,5 cząsteczki ATP, a podczas utleniania $FADH_2$ powstaje 1,5 cząsteczki ATP.

Szlak wydzielania konstytutywnego

Szlak prowadzący do wydzielania białek na powierzchnię komórki, prowadzący od siateczki śródplazmatycznej poprzez aparat Golgiego do pęcherzyków wydzielniczych, ulegających ciągłej egzocytozie. Nie wymaga specyficznej sekwencji sygnałowej.

Szlak wydzielania regulowanego

Podobnie jak szlak wydzielania konstytutywnego, prowadzi z siateczki śródplazmatycznej poprzez aparat Golgiego na powierzchnię komórki. W odróżnieniu od szlaku konstytutywnego wymaga udziału specjalnych pęcherzyków wydzielniczych, których egzocytoza zależy od specyficznych sygnałów. Wymaga obecności sekwencji sortujących.

Śródbłonek (endotelium)

Jest to pojedyncza warstwa płaskich komórek wyścielających światło naczyń krwionośnych oraz jam serca. Ze względu na syntezę licznych substancji komórki śródbłonka biorą udział w: regulacji przepływu krwi przez naczynia krwionośne oraz napięcia ich ściany, regulacji procesów krzepnięcia krwi, transporcie substancji z krwi do otaczających tkanek, procesach angio- i limfangiogenezy. Komórki endotelium tworzą także barierę pomiędzy krwią a różnymi tkankami i narządami oraz uczestniczą w funkcjonowaniu układu odpornościowego.

Tlenek azotu (NO)

NO jest nietrwałym, aktywnym związkiem, produkowanym w organizmie w komórkach endotelium przez śródbłonkową syntazę tlenku azotu (eNOS). Powoduje m.in. relaksację komórek mięśni gładkich ściany naczyń krwionośnych oraz ich rozszerzenie i zwiększenie przepływu przez nie krwi. Tlenek azotu posiada również właściwości hamujące agregację płytek krwi.

TNF (ang. *tumor necrosis factor*)

Czynnik martwicy nowotworów (kachektyna), działa cytotoksycznie na komórki.

Transkrypcja RNA

Jest to proces przepisywania informacji zapisanej w kolejności nukleotydów DNA na sekwencję nukleotydów w łańcuchu mRNA lub rRNA. Transkrypcja jest procesem wieloetapowym, w wyniku którego powstaje pierwotny transkrypt – pre-mRNA lub pre-rRNA. W procesie dojrzewania RNA (ang. *splicing*) uczestniczą liczne białka oraz niskocząsteczkowe RNA.

Translokacja białek do siateczki śródplazmatycznej

Kotranslacyjny import białek do siateczki śródplazmatycznej warunkowany obecnością N-końcowej **sekwencji sygnałowej** rozpoznawanej przez **cząstkę rozpoznającą sygnał** (**SRP**, ang. *signal recognition particle*). Kompleks rodzącego się białka, rybosomu i SRP łączy się z kanałem **translokonu**, poprzez który białko dostaje się do siateczki śródplazmatycznej.

Transport aktywny

Przykładem jest pompa sodowa przenosząca jony Na^+ na zewnątrz komórki i jony K^+ do komórki. Pompa zużywa energię ATP. Gradient jonów Na^+ powstały w wyniku działania pompy jest często dodatkowo wykorzystywany do wtórnego, sprzężonego aktywnego transportu wielu substancji.

Transport pęcherzykowy

Przemieszczanie się pęcherzyków transportowych pomiędzy poszczególnymi przedziałami szlaku wydzielniczego.

Transport prosty

Nie wymaga przenośników, gdyż małe, chociaż polarne cząsteczki, jak np. woda czy mocznik, a także gazy (CO_2, NO) dość łatwo dyfundują.

Transport ułatwiony

Odbywa się przez błony biologiczne z udziałem białek przenośnikowych i białek tworzących kanały. W błonie komórkowej są białka swoiście przenoszące aminokwasy, cukry, nukleozydy zgodnie z gradientem ich stężenia. Efektywność przenoszenia zależy też od liczby transporterów, co może być regulowane przez komórkę; np. transportery glukozy GLUT4 w adipocytach i komórkach mięśniowych przemieszczają się na powierzchnię komórki pod wpływem insuliny. Białka tworzące kanały to otwarte pory w dwuwarstwie lipidowej, przez które przenikają cząstki odpowiedniej wielkości i ładunku. Przenikanie przez niektóre kanały może być regulowane, gdyż mogą one przybierać konfigurację otwartą lub zamkniętą.

Ubikwitynacja białek

Kowalencyjne przyłączanie do innych białek jednej (**mono-**) lub wielu (**poli-**) cząsteczek drobnego białka **ubikwityny**. Ubikwitynacja spełnia rolę etykiety adresowej uczestniczącej w różnych procesach komórkowych. Jej głównym zadaniem jest wyznakowanie białek, mających ulec degradacji przez **proteasomy**. Ubikwitynacja wymaga kaskady enzymów: enzymu aktywującego ubikwitynę (**E1**), enzymu koniugującego ubikwitynę (**E2**) oraz ligazy ubikwityny (**E3**). Ubikwityna może zostać odłączona od białek pod wpływem **enzymów deubikwitynujących**.

Udział telomerów w starzeniu. Starzenie replikacyjne

Większość komórek organizmu dorosłego nie ma telomerazy, wobec czego telomery skracają się po każdym podziale. Całkowity zanik telomeru prowadzi do zahamowania cyklu komórkowego, co w ludzkich embrionalnych komórkach hodowanych *in vitro* następuje po ok. 50 podwojeniach populacji. Zahamowanie podziałów wskutek zaniku telomerów nazywa się **starzeniem replikacyjnym.** W zaawansowanym wieku brak telomerazy w większości komórek organizmu prowadzi do zaniku i uszkodzeń telomerów, czego konsekwencją jest zahamowanie cyklu komórkowego i biogenezy mitochondriów, osłabienie ich funkcji, narastanie stężenia wolnych rodników i spadek glukoneogenezy. Prowadzi to do degeneracji komórek i postępującego starzenia.

Uszkodzenia mitochondriów

Zmiany morfologiczne mitochondriów mogą występować w różnych patologicznych warunkach klinicznych i eksperymentalnych. Obserwuje się obrzmienia mitochondriów, tworzenie się struktur mielinopodobnych, zmniejszenie lub zwiększenie liczby i wielkości mitochondriów oraz obecność w matriks elektronowogęstych ziarnistości.

VEGF (ang. *vascular endothelial growth factor*)

Naczyniowo śródbłonkowy czynnik wzrostu stanowi grupę białek (VEGF-A, -B, -C, -D) odgrywających podstawową rolę w procesach waskulogenezy, angio- i limfangiogenezy. Wpływa głównie na komórki śródbłonka, stymulując je do proliferacji i migracji, co w konsekwencji prowadzi do tworzenia nowych naczyń krwionośnych oraz limfatycznych.

Wewnętrzna regulacja cyklu komórkowego

Cykl komórkowy jest napędzany i regulowany złożoną maszynerią białkową. Poszczególne fazy cyklu komórkowego są włączane w stałej kolejności i dopóki nie skończy się pomyślnie jedna faza, nie rozpoczyna się następna. Geny cyklu komórkowego, które kodują białka pobudzające cykl, nazywane są **protoonkogenami**, a te które kodują białka hamujące cykl – **genami supresorowymi**. Kluczową rolę w napędzaniu cyklu komórkowego odgrywają **kinazy zależne od cyklin – CDK,** aktywowane przez cykliny i fosforylację/defosforylację. Stężenie CDK w komórce jest stałe, a stężenie cyklin zmienia się w różnych fazach cyklu, aktywując różne CDK. Powoduje to przeprowadzenie komórki przez określoną fazę cyklu, jej zakończenie i rozpoczęcie następnej. Obok białek napędzających cykl istnieją również **inhibitory cyklu (CKI)**, które hamują cykl. Należą do nich białko RB i p53 oraz białka – produkty genów *INK4 i CIP/KIP*.

Wolne rodniki i glikacja: uszkodzenie makrocząsteczek

Uszkodzenia makrocząsteczek przez wolne rodniki i glikację prowadzą do powstawania i narastania zmian starczych w komórkach i istocie międzykomórkowej. Ubocznym produktem utleniania

są wolne rodniki, których stężenie w tkankach wzrasta z wiekiem wskutek ich nadmiernej produkcji i niewydolności antyoksydantów. Prowadzi to do uszkodzeń genomu, epigenomu, proteomu i lipidomu. Szczególne znaczenie w narastaniu zmian starczych mają mutacje i uszkodzenia DNA, karbonylacja białek oraz peroksydacja lipidów. Z wiekiem w organizmie postępuje także glikacja, a niesprawne, glikacjowane makrocząsteczki wywołują zmiany strukturalne i funkcjonalne komórek, przejawiające się postępującym starzeniem i chorobami mu towarzyszącymi.

Wrzeciono kariokinetyczne

Zorganizowany system mikrotubul powstający i funkcjonujący w czasie podziału komórki. Mikrotubule wrzeciona biorą czynny udział m.in. w ruchu chromatyd/chromosomów w czasie anafazy oraz w wyznaczaniu płaszczyzny podziału komórkowego.

Wrzeciono podziałowe

Jest strukturą składającą się z mikrotubuli kinetochorowych, ramiennych, biegunowych i astralnych oraz z białek towarzyszących mikrotubulom. W organizowaniu wrzeciona biorą udział centrosomy wraz z centriolami oraz specjalne białka końców mikrotubuli i cytoplazmy. Dzięki wrzecionu chromosomy są sytuowane w płaszczyźnie równikowej komórki, a następnie odprowadzane ku centrosomom. Wrzeciono podziałowe jest również odpowiedzialne za usytuowanie płaszczyzny cytokinezy, wielkość komórek potomnych oraz ich różnicowanie. Nieprawidłowości wrzeciona podziałowego oraz przechodzenia komórki przez mitozę powodują jej zahamowanie w tej fazie (**punkt kontrolny wrzeciona podziałowego**), co zapobiega aneuploidii.

Zapalenie starcze

Jest ukształtowanym ewolucyjnie przewlekłym zapaleniem, o słabym nasileniu, występującym u ludzi starzejących się. Charakteryzuje je przestrojenie odporności wrodzonej i nabytej oraz przewaga procesów uszkadzających nad reperacyjnymi. Kluczową rolę w zapaleniu starczym odgrywa czynnik transkrypcji **NFkB** i jego szlaki transdukcji sygnałów oraz kinaza **mTOR** aktywowana przez cytokiny prozapalne. NFkB jest aktywowany przez białka inflammasomu, cytokiny prozapalne, polisacharydy bakteryjne (LPS), uszkodzenia DNA oraz wolne rodniki i końcowe produkty glikacji (AGE). Efektem aktywacji NFkB jest aktywacja i transkrypcja prozapalnych cytokin, chemokin, cząsteczek adhezyjnych, cyklooksyganaz (COX), eikosanoidów, metaloproteaz, synatazy NO i innych, które należą do mechanizmów włączających zapalenie. Aktywowany NFkB reguluje proliferację/różnicowanie komórkowe i apoptozę oraz potęguje reakcje immunologiczne, prowadząc do zmian strukturalnych i upośledzenia funkcji, a w konsekwencji do starzenia entropowego oraz – w przypadkach szczególnie zaawansowanego starzenia – do chorób towarzyszących starzeniu: nowotworów, chorób sercowo-naczyniowych, przewlekłych chorób zapalnych, chorób neurologicznych, chorób metabolicznych, zapalenia stawów i kości, dystrofii mięśniowej, zespołu przewlekłego zmęczenia oraz zmian skórnych.

Zmienność genetyczna

Źródłem zmienności genetycznej zarówno międzygatunkowej, jak i międzyosobniczej, jest odmienność genomów. Różnice między genomami powstają wskutek mutacji genów bądź losowej segregacji puli genów w czasie powstawania komórek płciowych.

UNIWERSYTET ZIELONOGÓRSKI BU

SKOROWIDZ

A

Acylacja białek 112
Adenozynotrifosforan ATP 188
Adipofilina 173
Agammaglobulinemia Brutona 283
Agonista 197, 203
Agresomy 174
Akrecja 45, 85
Aksonema 139
Aktyna 145
– białka wiążące 132, 146
Aktywacja dopełniacza, drogi 257, 260
Alzheimera choroba 136
Amplifikacja 88
Anafaza 54
Analiza DNA 42
Anergia klonalna 282
Angiogeneza 301
Anoikis 75, 76
Antagonista 197, 203
Antygen 257
– mechanizmy prezentacji 275
Antyoksydanty 66
Aparat Golgiego 164
– mięśni kurczliwy 151
– replikacyjny 9
Aplazja 85
Apoptosom 73, 76
Apoptoza 73, 74
– metody wykrywania 81
Atrofia 85
Autofagia 70
Autokrynia 57
Autoradiografia 332

B

Badania mikroskopowe 321
Bardeta-Biedla zespół 141
Białka, acylacja 112
– adaptorowe 198
– aktynę wiążące 132, 146
– Bcl-2 73
– błonowe 101, 110
– – integralne 110
– – powierzchniowe 110
– chromatyny niehistonowe NHP 2
– ekspresja 42
– fazy ostrej 257, 260
– G 198
– kanały jonowe 119
– kotranslacja 110
– mikrotubulom towarzyszące 131
– motoryczne 132
– opiekuńcze 161, 173
– osadnicze 161, 164
– płaszcza 161
– prenylacja 113
– rozfałdowane, odpowiedź 162, 176
– SSB 1
– ubikwitynacja 162, 174
Białko glejowe kwaśne 142
– leukocytów integralne 115
– MRP 127
– obręczy ruchomej 11
– prążka 3, szczytu 115
– RB 57
– szoku cieplnego 173
Biblioteki DNA 42
Biogeneza rybosomów 23
Biosynteza lipidów błonowych 108
– neurotransmiterów 224
Blaszka jądrowa 4
Błona komórkowa 101, 103
– podstawna 245, 247
Błony biologiczne, transport cząstek 116
– zjawisko fuzji 128
Brutona agammaglobulinemia 283
Budowa łańcucha oddechowego 189
– przeciwciał 278

C

Centriole 139
Centromery 28
Ceramid 108
Chargaffa reguła 7
Cholesterol 101, 104
Choroba Alzheimera 136
– Creutzfelda-Jakoba 174
– Marfana 245
– mitochondrialna 194
Choroby autoimmunizacyjne 284
– degeneracyjne 62
– immunizacyjne 282
– nowotworowe 61
– proliferacyjne 46, 61
– sercowo-naczyniowe 61
Chromatosom 15
Chromatyna 13, 27, 28
– białka niehistonowe NHP 2
– pętle 16
– rozproszona 2
– skład 14
Chromosom interfazowy 28
– mitotyczny 28
– translokacja 292
Chromosomy 27, 28
Ciałka apoptotyczne 73, 75
– jądrowe 2, 17, 18
– zwinięte 19
Cockayne'a zespół 12, 71, 72
Creutzfelda-Jakoba choroba 174
Cukrzyca typu I 118
– – II 118
Cykl centrosomowy 50
– komórkowy 45-46, 49
Cykliny 46, 49, 257
Cytochemia lektyn 329
Cytochrom c 189
Cytokineza 55
Cytokiny 46, 57, 257, 260
Cytometria przepływowa 312, 333

Cytosol 163
Cytoszkielet 131, 132
Cytozyna, metylacja 292
Cząsteczki adhezyjne 231, 232
Czynnik martwicy nowotworów TNF 258, 261
– replikacyjny C 12
– transkrypcji jądrowy NFkB 69
Czynniki transkrypcyjne 35, 84, 89, 198, 206
– wzrostu peptydowe 92

D

Deacetylacja 64
Defenzyny 257, 259
Deficyty immunologiczne 282
Delecja 38
– klonalna 282
Deoksypuryny, nukleozydy 119
Deoksyryboza 7
Desmina 142
Desmosomy 248
Determinanty cytoplazmatyczne 84
– ooplazmatyczne 89
DiGeorge'a zespół 282
Diktiosomy 164
DNA 1
– analiza 42
– biblioteki 42
– glikacja 67
– jądrowy 67
– klonowanie 42
– mitochondrialny 68
– mutacje 1, 10, 38, 47
– naprawa 1, 10, 11
– plastyczność 8
– replikacja 1, 9
– – semikonserwatywna 11
– składniki 1, 7
– struktura 1, 7
DNP 1, 13
Dojrzewanie komórek 83
– RNA 2, 21
– – alternatywne 37
Domeny 16
– błonowe 107
Dopełniacz 257, 260
– drogi aktywacji 257, 260
Downa zespół 72
Drepanocytoza 13
Duchenne'a dystrofia mięśniowa 154
Duplikacja 38
Dwuwarstwa lipidowa 101, 104
– – funkcje podstawowe 109
– – płynność 105
Dyneina 132, 137
– rzęskowa 139
Dysocjacja, stała 203
Dystrofia Duchenne'a mięśniowa 154

E

Egzonukleazy 13
Eksony 21, 29
– rekombinacja 39
Eksportyny 5, 161
Ekspresja białek 42
– genów 83
– genu 32
Elastyna 242
Elektroforeza 311
Eliptocytoza wrodzona 150
Endocytoza 102, 126, 167
Endokrynia 58
Endonukleazy AP 12
Endoreduplikacja 56
Endosomy 166
Energia Gibbsa 188
– swobodna 188
– wiązań chemicznych 188
Epigenom komórki, zmiany 63
Epsteina-Barr wirus EBV 290
Euchromatyna 2, 28

F

Fagocytoza 126, 264
– nieswoista 264
– swoista 264
Fagocyty 262
Faza ostra, białka 257, 260
Fenotyp 37
FG nukleoporyny 5
Fibronektyna 232, 240
Fibrylina 242
Filamenty aktynowe 132
– pośrednie 131, 141
– – rola 143
Flopazy 80, 106
Fodryny 115
Fosfatazy białkowe 198, 205
Fosfatydyloseryna 80
Fosfolipidy 101, 108
Fosforylacja oksydacyjna 189
– – inhibitory 193
Fotoliaza DNA 11
Fragmenty Okazaki 10
Funkcja dwuwarstwy lipidowej 109
– macierzy jądrowej 7
Fuzja błon 102
– – zjawisko 128

G

G białka 198
Gen 29
Genom, poliploidyzacja 87
Genotyp 37
Geny 27, 29
– ekspresja 32, 83
– homeotyczne 84
– kontrola ekspresji 27, 32
– supresorowe 46, 57
– – nowotwory 288, 292
– zespoły 31
Gibbsa energia 188
Glanzmana trombastenia 234
Glikacja 48, 65, 66
– DNA 67
– hemoglobiny 67
– lipidów 67
– produkty końcowe zaawansowane 67
– wewnętrzna 67
– zewnętrzna 67
Glikoforyna 115
Glikokaliks 102, 116
Glikosfingolipidy 108
Glikozaminoglikany 232, 238
Glikozylazy DNA 12
Glikozylotransferazy 109
Golgiego aparat 164
Granulocyty obojętnochłonne 262
Grupy krwi 108

H

Helikazy 1, 12
Hemidesmosomy 249
Hemoglobina glikacja 67
Hemokrynia 58
Heterochromatyna 28
Hiperoksaluria typu I 171
Hiperplazja 49, 85
Hipertrofia 45, 49, 85
Hipoteza Mitchella chemiosmotyczna 180, 190
Histony 2, 14
– klasy 14
Homeodomeny 84
Homeoza 84
Hurler schorzenie 245
Hutchinsona-Gilforda zespół 72
Hybrydoma 129

Hybrydyzacja kwasów nukleinowych 311, 320

I

Immunocytochemia 312, 328
Immunoglobuliny 258, 278
– monoklonalne 102
– nadrodzina 235
Immunoproteasomy 176
Importyny 5, 161
Indukcja 84, 91
Informacja genetyczna, odczyt 20
– pozycyjna 84, 93
Informator pierwotny 197, 199
– wtórny 198
Inhibitory fosforylacji oksydacyjnej 193
– łańcucha oddechowego 193
– sirtuityny 65
Insercja 38
Integryny 231, 233
Interakcje receptor–ligand 202
Interchromatyna, strefa 16
– włókna 18
– ziarna 18
Interfaza 45
Interferon 261
Interleukiny 260
Introny 21, 29
Inwolucja 85
Inżynieria genetyczna 27, 41

J

Jąderka, typy strukturalno-czynnościowe 20
Jąderko 2, 19
– składniki 19
Jądro komórkowe 3, 163
– – blaszka 4
– – kompleks porowy 4, 161, 171
– – sekwencja lokalizacyjna 171
Jodek propidium 82
Jony wapnia, transport aktywny 122
– wodoru, transport aktywny 126
Jukstakrynia 58

K

Kadheryny 231, 234
Kaldesmon 155
Kalmodulina 155
Kanały jonowe 227
– – białka 119
– wapniowe 204
Kancerogeneza 287
Kaposiego mięsak 61
Karioferyny 172
Kaspazy 73, 75, 76
Kateniny 237
Kaweole 102, 126
Kinaza białkowa, zależność od cyklin 46, 49
– – – – DNA 13
Kinazy 198, 205
Kinezyna 132
Kinezyny 137
Klasy histonów 14
Klatryna 161
Klon komórkowy 85, 258
Klonowanie 86
– DNA 42
Koatomery 161
Kod genetyczny 29
Koenzym Q 189
Kolagen 232, 241-242
Kolagenopatie 242
Kolagenozy 242
Kompleks jądrowy porowy 4, 161, 171
– SNARE 199, 225
Komórka, kora 132, 150
– macierzysta 43, 85, 96
– NK 257, 264
– pluripotencjalna 84, 86
– totipotencjalna 84, 86
– zmiany epigenomu 63
Komórki dendrytyczne 265
– dojrzewanie 83
– Langerhansa 265
– macierzyste 43, 85, 96
– – indukowane pluripotencjalne 85
– nowotworowe 61
– odpowiedzi immunologicznej 258
– pluripotencjalne 86
– populacja 85
– śródbłonka 302
– – aktywowane 252
– totipotencjalne 86
– ukierunkowane 85, 86
Kompleks limfocytów T-receptorowy 267
Komunikacja endokrynowa 200
– międzykomórkowa 199
Kondensyny 53
Konekson 199
Koneksony 250
Kontrola ekspresji, geny 27, 32
– oddechowa 180, 192
– – współczynnik 180, 192
Kora komórki 132, 150
Kotranslacja 110
Krew, grupy 108
Krople lipidowe 172
Kwas deoksyrybonukleinowy DNA 1, 7
– – – analiza 42
– – – biblioteki 42
– – – glikacja 67
– – – jądrowy 67
– – – klonowanie 42
– – – mitochondrialny 68
– – – mutacje 1, 10, 38, 47
– – – naprawa 1, 10, 11
– – – plastyczność 8
– – – replikacja 1, 9
– – – – semikonserwatywna 11
– – – składniki 1, 7
– – – struktura 1, 7
– hialuronowy 240
– rybonukleinowy RNA 2, 9
– – – dojrzewanie 2, 21
– – – – alternatywne 37
– – – heterogenny 21
– – – informacyjny 20
– – – sekwencje korygujące 23
– – – transkrypcja 20
Kwasy nukleinowe, hybrydyzacja 320

L

Laktoferyna 258, 259
Laminina 232, 240
Laminopatie 145
Laminy 5
Langerhansa komórki 265
Leczenie nowotworów 288, 299
Lektyny 329
– cytochemia 329
Leukocyty, białko integralne 115
Li-Fraumeni zespół 61
Ligand 197, 202, 203
Ligazy 12
Limfocyty B 277
– – subpopulacje 278
– cytotoksyczne 272
– pomocnicze 271
– recyrkulacja 280
– regulatorowe 272
– T 267
– – kompleks receptorowy 267
– – subpopulacje 269
Limfokiny 260
Lipidy błonowe, biosynteza 108
– glikacja 67

Lizosomy 166
Lizozym 258, 259

Ł

Łańcuch oddechowy 180, 189
– – budowa 189
– – inhibitory 193
Łuska rybia wrodzona, naskórek rogowacenie 145
Łuszczyca 100

M

Macierz jądrowa 6
– – funkcja 7
Maillarda reakcja 67
Makrofagi 264
Marfana choroba 245
Martwica 74
Matriks mitochondrialna 184
Matryny 7
Mechanizmy odporności nabytej 267
– – wrodzonej 259
– prezentacji antygenu 275
Mejoza 41
Metafaza 54
Metaplazja 86, 96
Metody wykrywania apoptozy 81
Metylacja cytozyny 292
Metylotransferazy 11
Miażdżyca naczyń 47, 61
Mięsak Kaposiego 61
Mięśnie, aparat kurczliwy 151
Mikrofilamenty 132, 145
Mikrokosmki 150
MikroRNA 29
Mikrosatelity 31
Mikrotubule 131, 132
– astralne 141
– białka towarzyszące 131
– biegunowe 141
– kinetochorowe 141
– labilne 139
– powstawanie 134
– trwałe 139
Minisatelity 31
Miofilament cienki 154
– gruby 154
Miozyny 150
Mitchell, hipoteza chemiosmotyczna 180, 190
Mitochondria 163, 179, 181
– matriks 184
– morfologia 185
– piknotyczne 188
– uszkodzenia 179, 187
Mitoza 45, 46, 52
Modyfikacje epigenetyczne 83, 88
Monokiny 260
Morfogeny 84, 93
Morfologia mitochondria 185
MRP białko 127
Mukowiscydoza 176
Muramidaza 259
Mutacje DNA 1, 10, 38, 47
– genetyczne 63
– punktowe 38, 291
- somatyczne 63

N

Naczynia, miażdżyca 47, 61
Nadrodzina immunoglobulin 235
Naprawa DNA 1, 10, 11
Narządy, regeneracja 87
Naskórek 97
– oddzielenie pęcherzowe zwykłe 145
– rogowacenie, łuska rybia wrodzona 145
Nekroza 74
Neuropeptydy 199
Neurotransmiter 199
Neurotransmitery 223
– biosynteza 224
– klasyczne 199
– unieczynnianie 227
Neutrofile 262
Niedokrwistości 150
Niedokrwistość sierpowatokrwinkowa 13, 150
Nisza komórkowa 85
NK komórka 257, 264
Nowotwory, geny supresorowe 288, 292
– leczenie 288, 299
– łagodne 290
– złośliwe 290
Nowotwór, rozwój klonalny 289
Nukleoferyny 161
Nukleofilament 14
Nukleoporyny 4, 161
– FG 5
Nukleosom 14
Nukleotyd 7
Nukleozyd 7
Nukleozydy deoksypuryn 119
– puryn 119

O

Obszar jąderkotwórczy 19
Odczyt informacji genetycznej 20
Oddziaływania indukcyjne 91
Odporność nabyta, mechanizmy 267
– wrodzona, mechanizmy 259
Odpowiedź białek rozfałdowanych 162, 176
– humoralna 277
– immunologiczna, komórki 258
– – regulacja 281-282
– komórkowa 267
– nabyta (swoista) 258
– wrodzona (nieswoista) 258
Ograniczenie kaloryczne 48, 68
Okazaki fragmenty 10
Onkogeny 56, 287, 290
– wirusowe 287, 290
Operon 34
Oporność wielolekowa 127-128
Organizmy transgeniczne 42, 319
Ośrodki włókniste 19
Otoczka jądrowa 1, 4

P

Pamięć immunologiczna 280
– komórkowa 52, 64, 83, 95
Parakrynia 57
PCR reakcja 41, 312, 320
Pemfigoid 234
Peptydaza sygnałowa 162, 164
Perilipina 173
Peroksyny 162
Peroksyredoksyna 48, 68
Perychromatyna, ziarna 17
Pęcherzyki synaptyczne, recyrkulacja 226
Pętle włókien chromatynowych 16
Pinocytoza 126
Plastyczność DNA 8
Płynność dwuwarstwy lipidowej 105
Podwzgórze 70
Podziały komórkowe asymetryczne 84
Poliembrionia 86
Polimeraza DNA 9, 10
Polimerazy DNA 12
– RNA 34
Poliploidyzacja genomu 87
Połączenia jonowo-metaboliczne 250
– międzykomórkowe 231, 247
– zamykające 247
– zwierające 231, 247

Połączenie neksus 222
Pompa sodowa 121
– jonów wapnia 122
Pory jądrowe 4, 161
– – kompleks 171
Potencjały oksydoredukcyjne 180, 190
Powstawanie mikrotubul 134
Powtórzenia tandemowe 30
Prenylacja białek 113
Priony 174
Proces amplifikacji 88
Produkty glikacji końcowe zaawansowane 67
Profaza 53
Progerie 71
Proliferacja 45, 49
Prometafaza 54
Promotor 32
Proteasomy 162, 174
Proteoglikany 238
Protoonkogeny 46, 56, 288
Prowirusy endogenne 59
Prymazy 1, 9, 10
Przeciwciała 258, 278
– monoklonalne 129
Przekaźnictwo synaptyczne 200
Przerzuty nowotworowe, tworzenie 253
Przestrzeń interchromatynowa 2
Przyczepy ogniskowe 249
Pseudogeny 39
Puryny, nukleozydy 119

R

Rapamycyna 70
RB białko 57
Reakcja komórki 197
– Maillarda 67
– oksydoredukcyjna 190
– PCR 41, 312, 320
Rearanżacje genomowe 38
Receptor 197
– nikotynowy 228
Receptory 201
– błonowe 202
– jądrowe 202, 215
– jonotropowe 197, 203, 204, 228
– metabotropowe 198, 203, 205, 229
– śmierci 74
– wewnątrzkomórkowe 202
Recyrkulacja limfocytów 280
– pęcherzyków synaptycznych 226
Regeneracja narządów 87
– śródbłonka 304
Regulacja odpowiedzi immunologicznej 281-282
– transkrypcji 32, 33
Reguła Chargaffa 7
Rekombinacja eksonów 39
– homologiczna 13
– niehomologiczna 13
Replikacja DNA 1, 9
– semikonserwatywna 11
Replikony 51
Restenoza 61
Resweratrol 64
Retinoblastoma 57
RNA, dojrzewanie 2, 21
– – alternatywne 37
– heterogenny 21
– informacyjny 20
– sekwencje korygujące 23
– skład 2, 9
– struktura 2, 9
– transkrypcja 2, 20
Rodniki wolne 48, 65
Rola filamentów pośrednich 143
Rozrost komórek 49
Rozwój nowotworu klonalny 289
Różnicowanie komórek 83
Rybosomy, biogeneza 23
Rzęski 131

S

Sarkomery 151
Schorzenie Hurler 245
Sekwencja jądrowa lokalizacyjna 171
Sekwencje promotorowe 32, 33
– RNA korygujące 23
– regulatorowe 32
– rozproszone 31
– wyciszające 35
– wzmacniające 34
Selektyny 116, 231, 232
Sferocytoza wrodzona 150
Siateczka śródplazmatyczna gładka 164
– – szorstka 164
Siła protonomotoryczna 190, 191
Sirtuiny 64
Składnik gęsty włóknisty 19
– jąderka ziarnisty 19
Składniki DNA 1, 7
– jąderka 19
– RNA 2, 9
Skramblaza 106
Skrzep, tworzenie 253
SNARE kompleks 199, 225
Solenoid 2, 15
Spektryna 115
Spliceosomy 19, 21
SSB białka 1
Stadia różnicowania, tymocyty 268
Stała dysocjacji 203
Starzenie 47, 62
– deacetylacja 64
– przedwczesne, zespoły 71
– replikacyjne 47, 63
– tkanek 62
Statyny 70
Sterole 101
Strefa interchromatyny 16
Stres oksydacyjny 65
Struktura DNA 1, 7
– rDNA 2, 23
– RNA 2, 9
Subpopulacje limfocytów B 278
– – T 269
Substancja międzykomórkowa 238
Sulfiredoksyna 48, 68
Supresja aktywna 282
Synapsa chemiczna 199, 221
– elektryczna 198, 221, 222
Synapsyna I 199
Synaptofizyna 226
Synaptotagmina 225
Syntaza ATP 180, 191
Szlaki transdukcji sygnałów 58
Szok cieplny, białko 173

Ś

Śródbłonek 301
– komórki 302
– – aktywowany 252
– regeneracja 304

T

Tasowanie eksonów 39
Telofaza 55
Telomeraza 296
Telomery 28, 296
– zanik 47
Teoria zapalenia starczego 47, 62
Tkanki, starzenie 62
Tlenek azotu 301
TNF, czynnik martwicy nowotworu 258, 261
Tolerancja immunologiczna 282
Transdukcja, szlaki sygnałów 58
Transdyferencjacja 87
Transformacja nowotworowa 288
Transkrypcja 20, 32

Transkrypcja, czynnik jądrowy NFkB 69
– regulacja 32, 33
– RNA 2, 20
Translacja 20
Translokacja 38
– chromosomowa 292
Translokon 165
Transport aktywny 102, 120
– – jony wapnia 122
– – – wodoru 126
– cząstek, błony biologiczne 116
– jądrowo-cytoplazmatyczny 171
– pęcherzykowy 162, 167
– prosty 102
– tranzytowy 126
– ułatwiony 102
Transpozony 31, 40
Tratwy lipidowe 169
Triada mięśniowa 154
Trombastenia Glanzmana 234
Tubulina 132, 133
Tworzenie przerzutów nowotworowych 253
– skrzepu 253
Tymocyty, stadia różnicowania 268
Typy jąderek strukturalno-czynnościowe 20

U

Ubichinon 189
Ubikwityna 174
Ubikwitynacja białek 162, 174
Układ dopełniacza 260
– immunologiczny 259
– zgodności tkankowej główny MHC 258
– – – – – budowa cząsteczek 274
Unieczynnianie neurotransmiterów 227
Uszkodzenia, mitochondria 179, 187

W

Wektory 42
Wernera zespół 71
Wiązania chemiczne, energia 188
Widełki replikacyjne 9
Wirus Epsteina-Barr EBV 290
Wiskotta-Aldricha zespół 147
Witki 131
Włókna chromatyny, pętle 16
– interchromatyny 18
– perychromatyny 17
Włókno deoksyrybonukleoproteinowe DNP 1, 13
– nukleosomowe 14
Wrzeciono kariokinetyczne 131, 141
– podziałowe 46, 54, 131
Współczynnik kontroli oddechowej 180, 192

Z

Zanik telomeru 47
Zapalenie 68
– starcze 48, 62, 68
– – teoria 47, 62
Zasady pirymidynowe 1, 7
– purynowe 1, 7
Zellwegera zespół 170
Zespoły genów 31
– starzenia przedwczesnego 71
Zespół Bardeta-Biedla 141
– Cockayne'a 12, 71, 72
– DiGeorge'a 282
– Downa 72
– Hutchinsona-Gilforda 72
– Li-Fraumeni 61
– Wernera 71
– Wiskotta-Aldricha 147
– Zellwegera 170
Ziarna interchromatyny 18
– perychromatyny 17
Zjawisko fuzji błon 128
Zmiany epigenomu komórki 63
Zmienność genetyczna 27, 38
Zwierzęta transgeniczne 319